



---

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO CARLO BO  
DIPARTIMENTO DI  
SCIENZE DELLA TERRA, DELLA VITA E DELL'AMBIENTE  
(DiSTeVA)  
Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali  
(XXVIII ciclo)

***“Caratterizzazione di farmaci per la cura del  
cancro, di malattie neurodegenerative e  
infiammatorie per mezzo della tecnica EPR”***

*Settore Scientifico Disciplinare: CHIM/02*

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa  
**MARIA FRANCESCA OTTAVIANI**

Dottorando: Dott.ssa  
**CONCETTA COPPOLA**

Correlatore: Dott.ssa  
**MICHELA CANGIOTTI**

---

Anno accademico 2014-2015

# INDICE

---

Introduzione.....	5
Capitolo 1	
DENDRIMERI IN BIOMEDICINA .....	11
Introduzione.....	11
1.1 Storia ed evoluzione.....	12
1.2 Caratteristiche strutturali chimiche e biologiche .....	15
1.3 Metodiche di sintesi .....	19
1.4 Confronto con i polimeri biologici.....	22
1.5 Applicazioni .....	23
1.5.1 Dendrimeri in farmacocinetica .....	25
1.5.2 Dendrimeri nella cura del cancro.....	26
Capitolo 2	
FARMACI ANTITUMORALI .....	30
Introduzione .....	30
2.1 Imiquimod .....	32
2.1.1 Imiquimod: meccanismo d'azione.....	33
2.1.2 Imiquimod nell'immunità innata .....	34
2.1.3 Imiquimod nell'immunità adattativa .....	36
2.1.4 Imiquimod nell'apoptosi.....	38
2.2 1V209 .....	38
2.3 TMX 202 .....	39
2.4 TMX 302 .....	42
2.5 Ruolo degli agonisti dei TLR7.....	43
2.6 Ruolo degli antagonisti dei TLR7 .....	48
Capitolo 3	
MALATTIE NEURODEGENERATIVE E PEPTIDE AMILOIDE .....	51
Introduzione.....	51
3.1 Il Mordo di Alzheimer.....	52
3.2 "Ipotesi della cascata dell'Amiloide" .....	54
3.3 Neuropatologia .....	57
3.4 Peptide amiloide .....	61
3.5 APP (Amyloid Precursor Protein).....	63
3.6 Genesi della malattia .....	64
3.7 Diagnosi.....	66
3.8 Approcci terapeutici.....	69
3.8.1 Cure con medicinali .....	69
3.8.2 Cure senza medicinali .....	71
3.9 La chimica del rame .....	72
3.9.1 La chimica redox del rame.....	73
3.9.2 Il rame nel cervello.....	74
3.9.3 Ruolo del rame nell'AD .....	75

## Capitolo 4

<b>LINEE CELLULARI</b>	76
Introduzione	76
4.1 Linea cellulare MRC-5	77
4.2 Linea cellulare tumorale HCT-116	79
4.3 Linee cellulari Hek Blue e Null	80
4.3.1 Hek Blue hTLR7	81
4.3.2 HEK-Blue Null 1	87
4.4 Terreni di coltura	88

## Capitolo 5

<b>SPETTROSCOPIA EPR: TEORIA E PARAMETRI FONDAMENTALI</b>	90
Introduzione	90
5.1 Concetti generali di teoria classica	91
5.1.1 Risonanza paramagnetica elettronica applicata ai radicali nitrossido	95
5.1.2 Il vettore magnetizzazione	98
5.1.3 Tipologie di rilassamento per radicali nitrossido	98
5.1.4 Trattazione quantistica della forma di riga: tempo di correlazione ed equazione di Kivelson	100
5.1.5 Principali situazioni dinamiche del radicale nitrossido	101
5.1.6 Spin probe	103
5.2 Ioni di metalli di transizione ( $\text{Cu}^{2+}$ )	105
5.2.1 Interazione Zeeman	108
5.2.2 Interazione Iperfine	109
5.2.3 Interazione spin-spin	111
5.2.4 Spettri EPR di ioni $\text{Cu}^{2+}$	112
5.2.5 Il rilassamento e la larghezza di riga	113
5.2.6 Larghezza di riga per gli spettri dei complessi di $\text{Cu}^{2+}$	114
5.2.7 La forma di riga EPR per un insieme disordinato di molecole paramagnetiche	115
5.3 Strumentazione EPR	117
5.3.1 La sorgente	119
5.3.2 Il sistema di trasmissione delle microonde	120
5.3.3 La cavità risonante	120
5.3.4 L'iris	122
5.3.5 Il magnete	123
5.3.6 Il rivelatore	124
5.3.7 Il braccio di riferimento	124
5.3.8 Lo spettro	125

## Capitolo 6

<b>PREPARAZIONE DEI CAMPIONI</b>	126
Introduzione	126
6.1 Materiali	127
6.1.1 Dendrimeri PPI- $\text{SO}_3\text{G5}$	128
6.1.2 Sintesi dei dendrimeri polipropileniminici	128
6.1.3 Sonda radicalica	130
6.1.4 Buffer PBS	131

6.1.5 Metodi.....	132
6.1.6 Classificazione dei campioni.....	133
6.1.7 Preparazione della sonda radicalica.....	135
6.1.8 Preparazione peptide.....	137
6.1.9 Preparazione dendrimeri.....	137
6.1.10 Preparazione dei campioni.....	138
6.1.11 Preparazione bianchi.....	141
6.2 Materiali.....	143
6.2.1 Fosfodendrimeri.....	143
6.2.2 Sintesi dei fosfo-dendrimeri.....	145
6.2.3 Preparazione campioni (caratterizzazione dendrimero/Cu).....	146
6.2.4 Preparazione campioni (interazione dendrimero/linee cellulari).....	147
6.2.5 Metodi.....	148
6.2.6 Colorazioni vitali.....	148
6.3 Materiali.....	150
6.3.1 Sonda 5DSA.....	150
6.3.2 Sonda CAT 8.....	151
6.3.3 Sonda CAT16.....	152
6.3.4 Preparazione farmaci.....	153
6.3.5 Preparazione finale della soluzione dei farmaci.....	155
6.3.6 Allestimento terreni di coltura.....	156
6.3.7 Preparazione campioni.....	156
6.3.8 Detection kit.....	159
6.3.9 Analisi della citotossicità dei farmaci (mediante Trypan Blue).....	159
6.3.10 Calcolo per la conta mediante Camera di Burker.....	160
<b>Capitolo 7</b>	
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>161</b>
<b>Capitolo 8</b>	
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>214</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>220</b>

La presente attività di ricerca è incentrata sullo studio e caratterizzazione chimico-fisica di particolari strutture molecolari di interesse biologico, i dendrimeri; ma anche sulla caratterizzazione di una nuova classe di farmaci chemioterapici in fase sperimentale.

I dendrimeri sono dei sistemi macromolecolari monodispersi di forma sferica dotati di un nucleo polifunzionale dal quale dipartono ramificazioni che portano gruppi funzionali attraverso le quali avviene il riconoscimento del bersaglio cellulare.

Attualmente i nanocomposti dendrimerici (DNC) sono considerati come i migliori carrier di farmaci in funzione delle loro uniche proprietà:

- una struttura globulare ben definita e un peso molecolare prevedibile;
- la possibilità di controllare la loro dimensione che è legata al numero delle ramificazioni;
- la possibilità di funzionalizzare in modo differente la superficie dendrimerica a seconda del loro impiego;
- la loro mancanza d'immunogenicità, che permette scelte più sicure rispetto all'utilizzo di carrier peptidici;
- la loro capacità di alta penetrazione attraverso le membrane cellulari, consentendo un'elevata captazione di cellule tumorali o tessuti infiammati;
- la loro azione anti-amiloidogenica, grazie alla quale si arresta la formazione di oligomeri tossici tipici delle malattie neurodegenerative.

Oltre al ruolo di nanovettori, essi possono essere usati per altre finalità, come:

- nanoparticelle “telecomandate”, legandosi selettivamente alle singole cellule cancerose distruggendole in modo mirato;
- nanoprocessori da inserire nelle cellule per analizzare e controllare l'espressione genica;

- nanoterapia genica, riparazione dei difetti e mutazioni del DNA. Proprio in base alle differenti caratteristiche è possibile sintetizzare una miriade di classi dendrimeriche, per svariati sistemi da analizzare e studiare.

Nel presente lavoro di ricerca si è proceduto prima con la delineazione di due linee di ricerca improntate una sulla caratterizzazione di una classe di glicodendrimeri con il fine di studiare le proprietà anti-amiloidogeniche; l'altra sullo studio di una classe di fosfodendrimeri con il fine di monitorare l'attività antitumorale che li caratterizzano.

In entrambe le sperimentazioni, le analisi sono state eseguite mediante tecnica EPR, tecnica che risulta essere, per molti sistemi d'interesse chimico e biologico, il solo metodo di osservazione in grado di evidenziare variazioni nella struttura tridimensionale di un aggregato molecolare o di studiare il comportamento di specifici gruppi funzionali mediante l'ausilio di sonde paramagnetiche appositamente inserite nel sistema in esame.

### *Prima linea di ricerca*

A causa dell'invecchiamento della popolazione, una delle maggiori preoccupazioni per la salute dei prossimi decenni sarà inerente alle malattie neurodegenerative legate all'età.

Le malattie neurodegenerative sono un insieme composito di patologie del sistema nervoso centrale caratterizzate da un processo cronico e selettivo di morte cellulare a carico dei neuroni. Il deterioramento neuronale è causa di un irreversibile quanto inevitabile danno delle funzioni cerebrali che si manifesta, a seconda del tipo di malattia, con deficit cognitivi, demenza, alterazioni motorie e disturbi comportamentali e psicologici, più o meno gravi.

Il Morbo di Alzheimer è una malattia neurodegenerativa irreversibile, caratterizzata da una graduale perdita delle funzioni cognitive che inesorabilmente portano alla demenza.

Da una fase iniziale caratterizzata da una lieve perdita di memoria recente, la malattia avanza verso sintomi più devastanti come un difettoso giudizio, cambiamenti di personalità, completa perdita di ragionamento e perdita di autosufficienza.

Le due caratteristiche fondamentali del cervello AD sono: le placche amiloidi (placche senili) extracellulari e i grovigli neurofibrillari intracellulari. Circa il 90% delle placche amiloidi consistono nella forma aggregata di  $A\beta$ , questi aggregati amiloidi sono un marchio di garanzia dei sistemi nervosi affetti da AD.

La  $A\beta$  nel tessuto cerebrale esiste in diversi stati di aggregazione, come monomeri, dimeri e oligomeri; l'ulteriore aggregazione di questi ultimi genera le protofibrille ed infine le fibrille. Quest'ultime sono alla base della formazione delle placche, presenti sia nel cervello di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer, che in soggetti anziani sani. Una delle principali caratteristiche di AD è la presenza di alterate concentrazioni di ioni metallici nel cervello, come il Cu, questo interagisce strettamente, all'interno delle placche, con il peptide  $A\beta$ . I due aspetti fondamentali che sono stati studiati in questa tesi sono: l'influenza di ioni Cu(II) sull'aggregazione di  $A\beta$  e le proprietà anti-amiloidogeniche dei glicodendrimeri.

Le analisi effettuate, eseguite con la tecnica EPR, hanno dimostrato

che i glicodendrimeri sono privi di tossicità in quanto funzionalizzati con gruppi maltosio, sostanze zuccherine, che non sono tossiche per l'organismo, dimostrando di possedere un grande potenziale come agenti anti-amiloidogenici e agenti in grado di inibire la formazione di oligomeri tossici da parte del peptide A $\beta$ .

### *Seconda linea di ricerca*

Grazie alle loro dimensioni nanometriche, la stessa dei sistemi biologici, i nanomateriali riescono facilmente ad entrare all'interno delle cellule e scoprire dove e come si evolve un'alterazione potenzialmente pericolosa consentendo così un trattamento farmacologico attraverso vie innovative.

Per questi motivi, l'uso dei dendrimeri nella nanomedicina sta rapidamente crescendo e sta permettendo lo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche e terapeutiche al fine di consentire, eventualmente, anche il follow-up di patologie ereditarie e non.

La scoperta degli effetti antiproliferativi nei confronti di linee cellulari di tumori solidi e liquidi ha incentivato lo studio relativo la struttura e le proprietà di questi fosforo-dendrimeri.

Lo scopo del lavoro è stato quello di descrivere tutte le caratteristiche dei dendrimeri coniugati con il Cu (II), studiandone la modalità di coordinazione, la struttura chimica, la flessibilità e stabilità di questi complessi. Concludendosi con l'analisi dei complessi in relazione a sistemi biologici, quali la linea cellulare tumorale HCT-116 e la linea cellulare normale MRC-5, al fine di comprendere le relazioni esistenti e gli effetti che possono provocare sulle cellule.

Le accurate analisi EPR hanno permesso di monitorare e comprendere quali tra i nuovi dendrimeri sintetizzati possedessero la struttura più stabile e in grado di interagire nel miglior modo possibile con il Cu in modo da convogliarlo e farlo interagire con cellule tumorali affinché possa svolgere le sue peculiari attività antitumorali che lo caratterizzano.

Un *terzo* ed ultimo filo di ricerca è stato improntato sulla caratterizzazione di quattro farmaci chemioterapici in fase



sperimentale, quali Imiquimod, 1V209, TMX-202 e TMX-302.

La caratteristica principale di questi farmaci è la capacità di interagire con un recettore endosomiale che fa parte di una famiglia di recettori, che prende il nome di *Toll-like receptors (TLR)*.

Questi sono proteine transmembrana caratterizzate da un dominio extracellulare contenenti ripetizioni ricche di leucina e un catena citoplasmatica contenente una regione conservata chiamata dominio del recettore Toll/IL-1 (TIR). I Toll-like receptors riconoscono una vasta gamma di PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), porzioni di molecole tipiche di determinati patogeni, per cui presenti nell'organismo vanno a scatenare la risposta immunitaria. Ciascun tipo di PAMPs va ad attivare un recettore differente in modo maggiore, tra cui il recettore TLR7, il quale riconosce efficacemente piccole molecole sintetiche antivirali, per cui un filamento singolo di RNA può fungere da ligando naturale. La segnalazione dei TLR7, come anche per gli altri, è costituita da due pathways diversi: una via MyD88-dipendente, che stimola la produzione di citochine infiammatorie e un'altra via MyD88-indipendente associata alla stimolazione di INF- $\beta$  e alla maturazione delle cellule dendritiche. Infatti, in questo contesto, l'attenzione è stata rivolta agli agonisti dei TLR7 e i farmaci caratterizzati vanno proprio a legare e attivare il recettore scatenando la risposta immunitaria innata e adattiva. Anche in questo caso, lo studio dell'attività di questi quattro farmaci è stato effettuato mediante tecnica di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR).

Mentre l'Imiquimod è un farmaco già utilizzato da qualche anno sottoforma di crema per la cura di varie tipologie di malattia cutanea, gli altri sono molto più recenti. L'1V209 è un farmacoforo, al quale sono state aggiunte code fosfolipidiche e pegilate, andando a costituire rispettivamente il TMX-202 e TMX-302. Le varie diversità strutturali vanno a modificare le loro proprietà farmacologiche e, di conseguenza, la loro attività immunomodulatoria, in questo modo si cerca di sviluppare dei farmaci altamente efficaci e specifici rispetto a quelli già in uso. Ovviamente oltre a studiare le proprietà chimico-fisiche del sistema, in cui sono posti i farmaci, è stata valutata anche la citotossicità dei farmaci cui si può arrivare, poiché la coniugazione

delle cellule con i farmaci, oltre all'interazione con la membrana fosfolipidica di alcuni tipi cellulari specifici.

# DENDRIMERI IN BIOMEDICINA

---

### *Introduzione*

I dendrimeri sono molecole di nano-dimensioni, a simmetria radiale ben definita ed omogenea, caratterizzati da una struttura globulare e monodispersità. Nel corso degli ultimi due decenni il termine dendrimero è stato formalmente definito e il graduale interesse da parte della ricerca è evoluto da quello che era l'obiettivo primario, e cioè riuscire semplicemente nella loro sintesi, a rincorrere e sviluppare sempre nuove applicazioni. Oggi i progressi scientifici permettono non solo la sintesi di nuove classi dendrimeriche ma soprattutto la possibilità di coniugare covalentemente una vasta gamma di molecole bioattive alla superficie dendrimerica in modo da poter governare i loro comportamenti biologici, di incapsulare al loro interno molecole agendo da carrier, di fornire una piattaforma tecnologica altamente versatile ed estremamente potente per la somministrazione di farmaci. Sfide future, ma già vicine alla realizzazione, sono l'impiego di questi nanodispositivi nella diagnosi e nel trattamento del cancro ed in patologie neurodegenerative.

## 1.1 Storia ed evoluzione

Il loro nome deriva dal greco “*dendron*” (albero), e “*meros*” (ramo) e si riferisce alla loro struttura ad albero, essi infatti possono essere definiti come dei polimeri altamente ramificati; la loro crescita avviene per l’aggiunta di successivi punti di diramazione, ognuno dei quali aumenta la “generazione” del dendrimero. La prima ispirazione per la costituzione di una nuova classe di polimeri, simili ad alberi, fu del Dr. D. A. Tomalia<sup>1</sup>, ma fu Fritz Vögtle<sup>2</sup> nel 1978, ad effettuare la prima sintesi di questa nuova classe di macromolecole, sintesi che consiste nell’effettuare una “reazione di Michael” che favorisce l’aggiunta di acrilonitrile su gruppi amminici primari.

Dalla loro scoperta ad oggi la chimica dei dendrimeri è in grado di presentare un’ampia scelta di diverse tipologie di dendrimeri, scaturiti da diversi processi di sintesi e di funzionalizzazione, come i *Polimeri iper-ramificati*<sup>3</sup>, che derivano dalla ripetizione di una unità ramificata mediante polimerizzazione, caratterizzati da strutture irregolari e ricche di difetti. Essendo polimeri altamente polidispersi non sono adatti allo studio dei fenomeni chimici ma vengono per lo più impiegati per mimare le dinamiche d’azione di altri dendrimeri.<sup>3</sup>

Al contrario i cosiddetti *Dendrigrafts*<sup>4</sup> presentano una struttura ben definita e si sviluppano lungo una catena lineare polimerica lungo la quale si inseriscono altre catene lineari (copolimeri) creando un polimero iper-ramificato costituito da un numero fisso di unità polimeriche combinate. Considerando che i dendrimeri ricordano la tipica struttura di un albero, questi ricordano la struttura di alberi di palma.

Indichiamo qui di seguito le classi di dendrimeri più di interesse per gli scopi applicativi di cui ci stiamo interessando.

I dendrimeri biologicamente più innovativi e già utilizzati per scopi biomedici sono i cosiddetti *MAP-dendrimers*<sup>5,6</sup> (multiple antigen peptide) che sono costituiti da uno scheletro di polisina; la lisina funge da monomero dal quale far ripartire numerose ramificazioni; essi trovano largo impiego come vaccini e nelle tecniche di imaging.

I *PPI*<sup>7</sup>, dendrimeri polipropileniminici sono caratterizzati da ammine primarie che fungono da gruppi di superficie, facilmente funzionalizzabili, e hanno un core costituito da ammine terziarie. Questa è la prima classe di dendrimeri sintetizzata.

Seguono i *dendrimeri PEI*<sup>7</sup>, una sottoclasse dei PPI, il cui core è costituito da diamminoetano o diamminopropano.

I dendrimeri *PAMAM*<sup>8,9,10</sup>, ideati e ottenuti da Don Tomalia con il quale collabora il nostro gruppo di lavoro, sono poliammidoammine, il cui core è un'ammina che viene fatta interagire con acrilato di metile e con etilendiammina per ottenere la generazione 0. Da questa poi si dipartono generazioni di ammidoammine che, nella generazione 6, mimano gli istoni per il trasporto genico alle cellule. Questi dendrimeri vengono adesso commercializzati e sono tra i più studiati e utilizzati per applicazioni biomediche.

I *Frèchet-dendrimers*<sup>10,11</sup> prendono il nome dallo scienziato che li ha ideati e sono caratterizzati da uno scheletro di polibenziletere, quindi idrofobico. I gruppi superficiali sono costituiti da acido carbossilico e fungono da ponteggio per altri eventuali gruppi di superficie per favorire un'ulteriore funzionalizzazione della superficie per renderla più polare e quindi aumentare la solubilità del dendrimero.

I fosfodendrimeri sintetizzati dal Prof. Majoral (CNRS di Tolosa) trovano già applicazione per la cura del cancro in quanto vengono funzionalizzati con unità chemioterapiche.

In generale tutti i dendrimeri se pur diversi per sintesi e funzionalizzazione, sono accumulati dalla medesima terminologia, ad

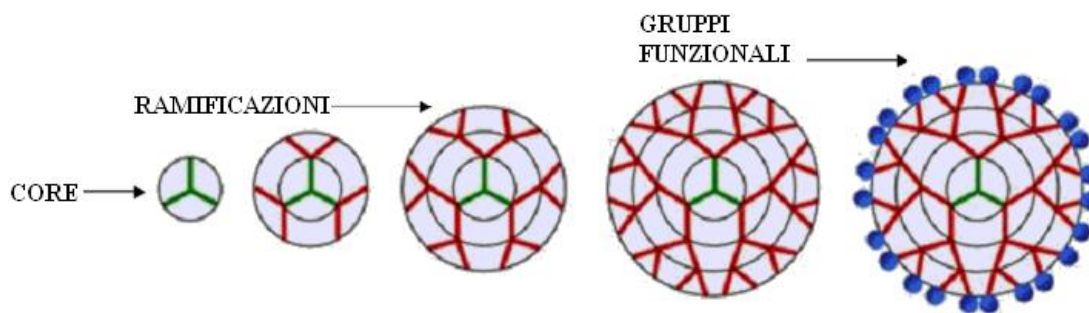
esempio con il termine *dendrone*<sup>10,11</sup> si indica un ramo dendrimerico privo di core: questi permettono la creazione di numerosi dendrimeri che differiscono per struttura e funzione. Generalmente i dendrimeri si sintetizzano mediante l'assemblaggio di più dendroni. Mentre con il termine *generazione* si indica la “distanza” che intercorre tra il core e la periferia del polimero, tale distanza è calcolata in base ai punti di ramificazione, ad es. un dendrimero con cinque punti di ramificazione è caratterizzato da una generazione 5, indicata come G5. La parte interna o core è talvolta indicata come G0, mentre durante le fasi di sintesi le diverse parti vengono definite come half-generations. Tra i diversi livelli di generazione si possono individuare gli *shell* o *gusci* che differiscono tra quelli interni e quello esterno che corrisponde alla superficie del dendrimero. Sulla superficie vengono individuati i *gruppi di superficie* o *gruppi terminali* dai quali scaturiscono le proprietà fisico-chimiche dei polimeri.

Da questa vasta gamma di famiglie dendrimeriche si generano differenti potenziali applicazioni sia in campo chimico e farmaceutico che biologico. Ampiamente utilizzati sono i PAMAM, PPI e i dendrimeri di Polifenilene; i primi grazie ai loro gruppi amminici primari permettono reazioni di assemblaggio molto semplici; essendo dendrimeri cationici con un nucleo flessibile permettono ad esempio di inserire al loro interno acidi nucleici<sup>12,13</sup>; al contrario gli ultimi sono dendrimeri non ramificati che trovano largo impiego in ambiente biologico<sup>14,15</sup>. Altre specie interessanti sono quelle derivate dal N-TRIS<sup>16</sup>, SILICIO, FOSFORO<sup>17,18</sup>, POLIESTERE, POLIGLICEROLO<sup>19,20</sup> che vengono largamente utilizzate nelle applicazioni biologiche.

## ***1.2 Caratteristiche strutturali chimiche e biologiche***

I dendrimeri sono composti oligomerici o polimerici con un'architettura tridimensionale, scaturita dall'elevato numero di ramificazioni che si diramano, in modo ordinato, in tutta la struttura della molecola e che permettono di aggiungere un diverso quantitativo e qualitativo numero di gruppi superficiali, che ne aumentano la funzionalità. Risultano essere monodispersi, ovvero la loro struttura è ben definita e il numero di unità terminali è determinato, e dipende dalla generazione del dendrimero. La forma è di tipo globulare, con un'alta densità di funzionalità rispetto al volume; il volume idrodinamico risulta minore rispetto ai consueti polimeri lineari<sup>21</sup>. E' importante notare che il diametro del dendrimero aumenta linearmente al crescere della generazione, mentre il numero di gruppi funzionali terminali aumenta esponenzialmente. La conseguenza di tale proprietà è che maggiori sono le dimensioni, maggiore sarà la concentrazione e la vicinanza dei gruppi posti sulla superficie. D'altra parte questo fa sì che mentre i dendrimeri più piccoli sono flessibili e aperti, quelli di generazioni superiori diventano sfere più rigide e meno deformabili<sup>22</sup>.

Dal punto di vista strutturale, queste macromolecole sono distinte in tre differenti zone: il "core" o centro iniziatore, una parte intermedia che contiene tutte le ramificazioni che partono dal core, che possono dare origine alle ramificazioni successive, definite "generazioni", ed infine una zona più esterna dove si trovano i gruppi terminali superficiali che possono essere diversificati tramite funzionalizzazione "ad hoc".



*Figura 1: rappresentazione schematica di un dendrimero*

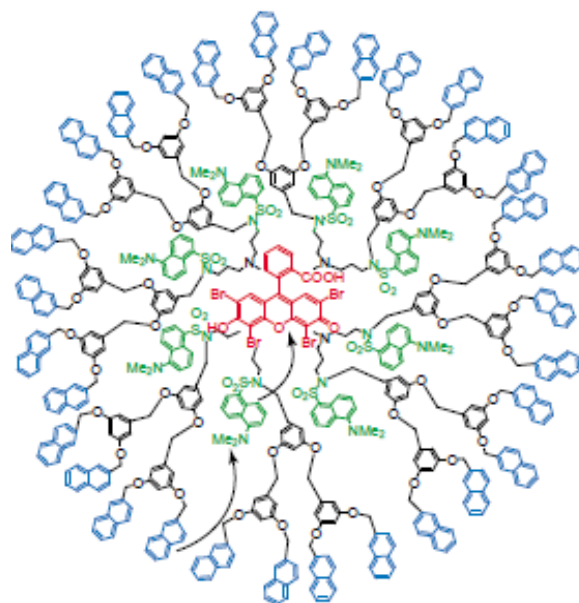
Dal punto di vista topologico si distinguono un nucleo polifunzionale, degli strati interni e la superficie.

- Il “**core**” ha un’importanza fondamentale nel caratterizzare la struttura finale, in particolare va ad influenzare la forma, le dimensioni e la molteplicità del dendrimero. Il nucleo può essere costituito da un singolo atomo o da una molecola, comunque polifunzionali; può essere omogeneo con gli altri componenti oppure eterogeneo e può ospitare speciali composti come atomi metallici rivestendo funzioni specifiche.
- La “**zona intermedia**”, denominata regione interna, è caratterizzata da un sistema simmetrico di ramificazioni che si viene a formare con il livello generazionale. Questa zona conferisce alla molecola sia proprietà fisiche sia chimiche peculiari, caratterizza la flessibilità dell’intera molecola e influenza la presenza di volumi interni liberi disponibili ad ospitare altri composti. Il concetto di ramificazione dendritica si basa su nozioni matematiche e geometriche che spiegano come la molecola si sviluppi attorno ad un punto di riferimento, occupando lo spazio tridimensionale con i suoi atomi e le sue unità ripetitive. La struttura ramificata del corallo, gli alberi, le reti fisiologiche sono dei modelli reali a cui si può fare riferimento per la rappresentazione di queste molecole. La tipica struttura si sviluppa in modo radiale attorno al ‘core’ iniziale provocando un



aumento del numero di gruppi terminali ed un infittirsi delle ramificazioni.

- La “**regione superficiale**” è costituita dalle unità terminali. In alcuni gruppi di dendrimeri è possibile affermare che partendo dal core si raggiunge un qualunque gruppo terminale facendo sempre lo stesso percorso. In altri sistemi questo non accade, perché i punti di giunzione tra una generazione e l'altra per ogni singolo ramo hanno una molteplicità maggiore di uno. Da un punto di vista topologico, la prima caratteristica elencata permetterebbe di affermare che teoricamente ogni gruppo terminale di una stessa generazione si trova alla stessa distanza dal nucleo. In questo modo restano definiti i punti di una sfera con un determinato raggio  $R$ , con  $R=f(G_i)$ . Poiché i sistemi biologici presentano spesso una forma sferica o ramificata, per poter sviluppare delle applicazioni in campo biomolecolare è di fondamentale importanza riuscire a creare dei dendrimeri in cui forma, dimensioni e caratteristiche superficiali riproducano il più possibile quelle di tali sistemi. La superficie dei dendrimeri non svolge solamente la funzione di protezione dei gruppi interni, ma può anche reagire, grazie ai suoi siti attivi, con reagenti esterni e solventi; inoltre si possono introdurre dei composti chimici che consentano ai dendrimeri stessi di svolgere determinate funzioni o di assumere determinate proprietà come particolari attività ottiche, interazioni antigeniche, modificazioni della stechiometria o della solubilità e processi di chelazione e stratificazione.



**Figura 2:** immagine schematizzata di un dendrimero

Inoltre possiamo evidenziare differenze strutturali e funzionali fra dendrimeri con un numero di generazioni  $<4$  detti “*earlier generations*” e quelli con un numero di ramificazioni  $>4$  detti “*later generations*”. I primi, dalle dimensioni più piccole, sono caratterizzati da una minor densità dei gruppi superficiali, ossia presentano una struttura più aperta, con le catene piuttosto distanziate, che rende la parte interna del dendrimero più accessibile ad un solvente. Inoltre la loro struttura appare di forma discoidale e fortemente asimmetrica. Al contrario, i dendrimeri appartenenti alla later generations sono di maggiori dimensioni e forma sferica, evidenziano una struttura esterna compatta ad alta densità di gruppi superficiali e presentano delle cavità interne connesse da canali che rappresentano i siti leganti per le molecole “ospiti”. Tali cavità interne possono possedere un carattere essenzialmente idrofilo, che permette l’accesso, ad esempio, a ioni carichi positivamente; tuttavia spesso coesistono siti a bassa polarità che possono interagire con specie idrofobe; infatti un’importante caratteristica di queste macromolecole è proprio la possibilità di intrappolare altre molecole di vario tipo e dimensioni in tali cavità interne.

I dendrimeri, avendo l’interno formato da legami covalenti, sono poco flessibili, ma allo stesso tempo poco compatti. La struttura comunque

può variare in dipendenza della polarità del solvente, del pH e della forza ionica, per cui il dendrimero può assumere diverse conformazioni<sup>23</sup>; è anche intuitivo quindi che, variando la natura del core e quella delle unità monometriche ad esso collegate, sia possibile ottenere una vasta gamma di dendrimeri diversi dal punto di vista strutturale e chimico-fisico.

### ***1.3 Metodiche di sintesi***

Le strutture chimiche usate per la loro sintesi sono le più svariate, e permettono di variare le caratteristiche fisiche e chimiche, come l'idrofobicità, del dendrimero; tra le più usate e studiate si possono citare le poliammine<sup>24</sup>, poliammidi e ammine<sup>25</sup> (come nel PAMAM), o i poliarileteri<sup>26</sup>. I dendrimeri vengono sintetizzati in processi di tipo step-wise, attraverso una sequenza di reazioni ripetute. Vi sono essenzialmente due strategie sintetiche che possono essere adottate per la preparazione di dendrimeri: l'approccio divergente e l'approccio convergente.

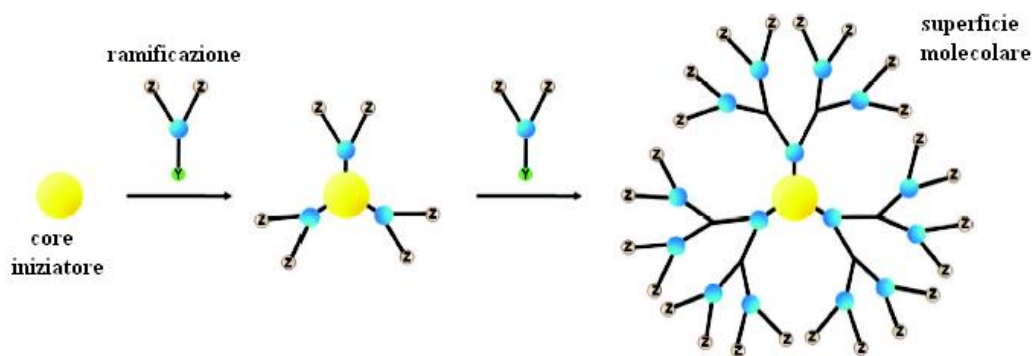
Con il metodo “*divergente*”, i dendrimeri si accrescono partendo dalla molecola di core centrale a cui vengono aggiunti successivamente i monomeri. Questa tecnica consiste in due stadi di sintesi che, se ripetuti, permettono di ottenere dendrimeri di diverse generazioni.

- **1° stadio:** le molecole di monomeri vengono fatte reagire con un core multifunzionale. Ciascuna delle molecole contiene un sito reattivo e due gruppi silenti; in questo modo si origina la prima generazione.
- **2° stadio:** l'estremità del dendrimero G1 viene attivata per reagire con altri monomeri. Ripetendo il secondo stadio per più generazioni, il dendrimero viene costruito strato dopo strato.

Tuttavia, si possono verificare delle reazioni incomplete o collaterali durante la sintesi dei dendrimeri a generazioni superiori, ottenendo

così difetti strutturali e preparati non omogenei. Quando si raggiunge un livello di ramificazione “critico”, i dendrimeri non possono crescere ulteriormente a causa dell’ingombro sterico dovuto alla crescente densità del dendrone. Tale fenomeno è noto come “effetto starbursts”, solitamente osservato nelle generazioni maggiori<sup>27,28</sup>. Per impedire il verificarsi di tali problemi e per portare a termine la reazione occorre utilizzare reagenti in eccesso, ma questo può causare difficoltà nella purificazione del prodotto finale.

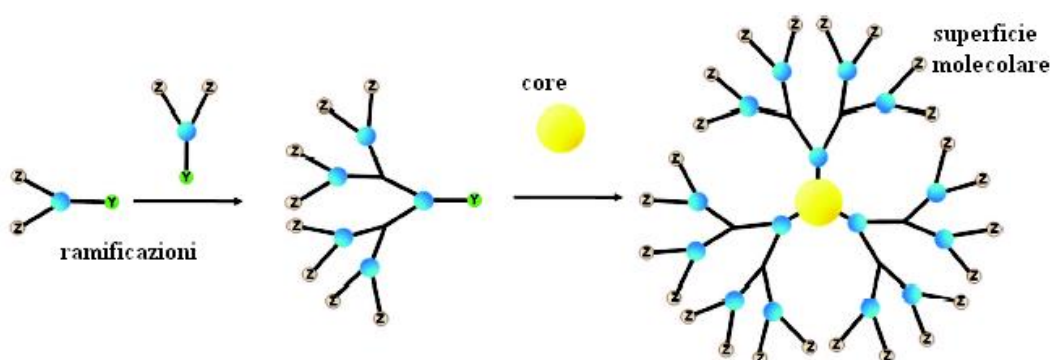
L’approccio divergente, è una crescita veloce, efficace per la produzione di grandi quantitativi di dendrimeri.



**Figura 3:** sintesi divergente

Il metodo “*convergente*” si è sviluppato in risposta agli inconvenienti della sintesi divergente. Nell’approccio convergente, il dendrimero viene sempre costruito con processi a tappe, ma con un procedimento inverso, partendo questa volta dai gruppi terminali e continuando verso l’interno. I polimeri nascenti (chiamati dendroni) si diramano, e quando hanno raggiunto la larghezza giusta, a seconda del dendrimero che si vuole ottenere, i dendroni vengono attaccati alla molecola multifunzionale che rappresenta il core. Il metodo di crescita convergente ha numerosi vantaggi: innanzitutto purificare il prodotto che si vuole ottenere si è rivelato relativamente facile, inoltre la possibile presenza di difetti nella struttura finale è fortemente

minimizzata. E' inoltre possibile introdurre all'interno della struttura dendritica, tramite sofisticate tecniche ingegneristiche, gruppi funzionali in spazi precisi alla periferia della molecola. L'inconveniente maggiore nel quale si incorre utilizzando il metodo convergente è che esso non consente la formazione di un elevato numero di generazioni, in quanto possono incorrere problemi sterici nelle reazioni fra i dendroni e la molecola del core.



**Figura 4:** sintesi convergente

Indipendentemente dalla modalità di sintesi, i dendrimeri possono avere un diametro che va dai 10 Å ai 100 Å, con un aumento di circa 10 Å per ogni generazione ed un peso molecolare simile a quello delle proteine (in un range che va da 517 a 935000 Da).

Inoltre, all'aumentare delle generazioni, il volume del dendrimero cresce in modo esponenziale, si distingue perciò una generazione limite detta di “Gennes” (G10), oltre la quale non si può andare, perché aumentando il numero di strati, a causa dell'impacchettamento delle ramificazioni esterne, la crescita uniforme diviene impossibile, si parla di “limite di saturazione superficiale”.

## ***1.4 Confronto con i polimeri biologici***

Sia i polimeri dendrimerici che quelli biologici, presentano una forma globulare, sono composti da unità monomeriche ripetute, caratterizzati da un'architettura ben definita, presentano dimensioni comparabili e hanno entrambi superfici presentanti siti chimici reattivi<sup>33,34</sup>. Inoltre, l'interno di una molecola dendrimerica ricorda quello di una proteina biologica, in quanto presenta microambienti unici che favoriscono il riconoscimento molecolare.

La possibilità di creare e sfruttare monospazi all'interno del dendrimero deriva da due proprietà intrinseche, in primo luogo queste macromolecole presentano una struttura semi-globulare o completamente globulare contenente spazi interni consentendo come le proteine il fenomeno della catalisi<sup>35,36,37</sup>. In secondo luogo, sono molecole molto flessibili e deformanti, che possono riproporre il sistema “chiave-serratura”, tipico delle proteine<sup>38</sup>. Questo riconoscimento molecolare è un processo fondamentale nella biologia e nella chimica, senza il quale la vita non potrebbe esistere. La capacità intrinseca dei dendrimeri di effettuare un riconoscimento molecolare può essere sfruttato per favorire il riconoscimento dei biomarcatori di superficie che contraddistinguono ad esempio le cellule tumorali.

A differenza dei dendrimeri, le proteine sono meno flessibili, anche perché un notevole dispiegamento potrebbe indurre una situazione termodinamica sfavorevole<sup>39</sup>. Dal confronto fra le superfici dei due diversi polimeri, si evince che entrambe sono caratterizzate dalla presenza di gruppi funzionalizzati chimicamente attivi e accessibili, anche se i gruppi attivi delle catene laterali delle proteine sono sepolti nella struttura globulare della proteina stessa. Al contrario, tutti i siti attivi presenti sui dendrimeri sono accessibili e quindi funzionalizzabili, dato che sono tutti orientati verso l'esterno.

Queste importanti similitudini sono alla base delle diverse applicazioni dei polimeri dendrimerici in ambito biologico.

### ***1.5 Applicazioni***

I dendrimeri attirano un elevato interesse per le loro possibili applicazioni in campo biologico-farmaceutico, sia per le loro caratteristiche intrinseche, sia per la possibilità di essere derivatizzati con i gruppi più svariati. Possono essere infatti coniugati, in modo multivalente, a molecole attive farmacologicamente, a ligandi per target biologici, a probe di fluorescenza o ad agenti di contrasto per l'imaging<sup>40</sup>. Rispetto ai polimeri lineari la loro tossicità è inferiore grazie alla loro struttura globulare che causa una minore adesione aspecifica alle superfici cellulari<sup>41</sup>.

Le loro proprietà inusuali e rilevanti permettono processi di complessazione/coordinazione di ioni metallici, questo grazie alla capacità di incapsulare gli ioni mediante interazioni host-guest; svolgono funzioni di carriers metallici, sottolineando come a differenza dei marker metallici questi non tendano ad accumularsi e quindi di conseguenza risultino meno tossici.

Sono ottimi traslocatori di farmaci, i quali possono essere caricati all'interno del core della molecola trasportatrice, o legati alle ramificazioni esterne, questo grazie alla natura solubile di alcuni dendrimeri.

Infatti le interazioni possono avvenire nel core (endorecettore), o nello strato esterno (esorecettore), ne segue un largo impiego in campo biologico, ad esempio nel campo della diagnosi in vitro, dove sono utilizzati come mezzi di contrasto (imaging di risonanza), nel campo della complessazione e separazione dei metalli e nella catalisi.

Inoltre l'interno del dendrimero si presenta come un ambiente chimico particolare, con una diffusione limitata delle molecole del solvente. In soluzione acquosa agiscono quindi come delle "micelle molecolari", dissolvendo grazie al loro interno idrofobico molecole apolari; per questo vengono studiate le applicazioni come carriers per il trasporto di molecole bioattive come gli steroidi. Il binding può avvenire anche sulla superficie esterna, ad esempio se derivatizzati con uree legano efficacemente i peptidi<sup>42</sup>.

Le strutture di tipo PAMAM trovano applicazione per il delivery di geni o inibitori nel nucleo delle cellule, per terapie genetiche o di antisense, grazie all'interazione tra le cariche positive del dendrimero, e le cariche negative dei polinucleotidi, essendo quindi in grado di interagire con i gruppi fosfato degli acidi nucleici, favoriscono la formazioni di complessi di trasfezione, aumentando anche l'efficienza del meccanismo genetico<sup>43,44</sup>.

Trovano applicazione anche come antivirali, inserendo, infatti, gruppi anionici sulla superficie (come sulfonato o acido sialico) che interagiscono con i carboidrati acidi presenti sulla superficie delle cellule, si ottengono strutture in grado di ostacolare il meccanismo virale. Il dendrimero compete quindi nel binding con la superficie cellulare con il virus, diminuendo la probabilità di infezione<sup>45</sup>. I semplici peptidi solitamente non sono in grado di provocare una risposta immunitaria se iniettati come tali, è quindi necessario aumentare il peso molecolare per polimerizzazione o per coupling con un carrier, solitamente una proteina derivatizzata. In questo campo i dendrimeri si sono rivelati utili, in quanto possono agire da carrier multivalente per sostanze antigeniche, legando i peptidi ai gruppi sulla superficie esterna. Un esempio molto usato sono i MAP (multiple antigenic peptide), strutture ramificate formate dal coupling di lisine. Quella che si ottiene è una struttura dendrimerica asimmetrica, in cui



i gruppi amminici  $\alpha$  e  $\epsilon$  della lisina possono essere usati per legare antigeni di basso PM, in cluster di 4 o 8, riuscendo ad ottenere una risposta immunitaria<sup>46</sup>. Oltre a peptidi possono essere legati anche antigeni di tipo glicosidico per ottenere vaccini artificiali<sup>47</sup>.

Altri dendrimeri, a seguito di processi chimici, quali l'acetilazione e conseguente coniugazione con specifiche sonde, fungono da potenziali vettori anti-tumoral.

Oltre alle diverse applicazioni biomediche, trovano largo impiego anche in processi industriali; grazie alle loro "grandi dimensioni superficiali" e alla loro solubilità<sup>48</sup> vengono utilizzati come catalizzatori; hanno un largo impiego nella rilevazione e nei diodi organici foto emittenti.

Inoltre la funzionalizzazione dei dendrimeri con mono o oligosaccaridi semplici permette di sfruttare l'effetto cluster per ottenere leganti altamente specifici per l'interazione con proteine, come vedremo in questo lavoro di tesi, e superfici cellulari, in molti casi riuscendo a competere con i leganti naturali.

### *1.5.1 Dendrimeri in farmacocinetica*

A seconda della loro composizione chimica, i dendrimeri presentano diverse proprietà adatte sia per la formulazione che per la somministrazione dei farmaci<sup>49,50,51</sup>. Tali proprietà sono un peso molecolare non elevato, dimensioni nanometriche, particolari strutture architettoniche, multi valenza, possibilità di utilizzarli con differenti ph, solubilità in diversi media e elevata biodegradabilità. Ad esempio farmaci convenzionali scarsamente solubili in acqua possono essere intrappolati nelle cavità interne dei dendrimeri per poi essere solubilizzati in acqua, offrendo così la possibilità di formulare, somministrare e migliorare la biodisponibilità del farmaco stesso<sup>52,53</sup>.

Il rilascio del farmaco è regolato dalle proprietà fisico-chimiche del polimero, nonché dalla generazione stessa, infatti all'aumentare di questa aumentano sia gli spazi interni dove inserire il farmaco, ma anche i gruppi di superficie dove legare il farmaco. Molto dipende anche dalla forma, dalla solubilità stessa del polimero, dalla possibilità di coniugare il farmaco mediante ligandi target o sensori molecolari, macromolecole come PEG o come l'acido laurico  $C_{12}$ <sup>54,55,56</sup>. Tutto questo spiana la strada alla progettazione di piattaforme complesse multifunzionali impiegate nelle applicazioni terapeutiche e per costruire terapie personalizzate.

### *1.5.2 Dendrimeri nella cura del cancro*

La scoperta, la progettazione, lo sviluppo di agenti terapeutici antitumorali hanno dimostrato di essere in notevole difficoltà nonostante gli intensi sforzi della ricerca nel corso degli ultimi decenni. Le ragioni di questo lento progresso sono da ricercare nelle sfide che un farmaco antitumorale deve superare: un farmaco deve essere in grado di individuare i sottili cambiamenti che distinguono una cellula tumorale dalle altre duecento diverse tipologie di cellule sane che si trovano nel corpo e quindi riconoscerla, essere in grado di fornire una dose sufficientemente elevata di agente tossico per uccidere tale cellula. Le difficoltà sono amplificate dal potenziale di metastasi che posso generarsi e quindi richiedere la necessità di traslocare il farmaco in differenti regioni del corpo.

Ecco che nasce la possibilità di funzionalizzare la superficie dendrimerica con ligandi che permettono il riconoscimento della cellula trasformata. Un esempio di ligando ampiamente utilizzato è il *folato*, poiché la maggior parte delle cellule tumorali esprimono sulle proprie membrane il recettore FR specifico per la molecola. 57

I dendrimeri accuratamente funzionalizzati riconoscono in maniera selettiva le cellule bersaglio, avvenuto il riconoscimento interagiscono con la membrana cellulare.

Diversi studi suggeriscono che il legame con la membrana cellulare è facilitato dalle proprietà deformabili del polimero<sup>58,59</sup>. Quando un dendrimero entra in contatto con una cellula, la superficie del polimero subisce una forte attrazione che induce una distorsione della struttura dendrimerica affinché le due parti possano aderire perfettamente.<sup>60</sup> Avvenuto il riconoscimento, si generano dei piccoli fori a livello della membrana cellulare che permettono l'ingresso del polimero <sup>61</sup>, una volta all'interno questo influenza il traffico subcellulare.

Le ipotesi future non solo riguardo la possibilità di funzionalizzare specificatamente i dendrimeri nei confronti delle cellule bersaglio, ma anche funzionalizzarli con particolari radioisotopi<sup>62,63,64,65</sup> che permettano di analizzare la distruzione e la localizzazione della massa tumorale, dando così l'avvio a nuove procedure diagnostiche.

Fondamentale è la biocompatibilità di queste molecole con i sistemi biologici in esame, biocompatibilità intesa come solubilità in acqua, immunogenicità e tossicità. Generalmente la solubilità può essere rettificata modificando la natura chimica della superficie, la coniugazione di molecole PEG ha come effetto quello di aumentare la solubilità e di conseguenza ridurre i problemi relativi all'immunogenicità<sup>66</sup>. Per quanto riguarda la tossicità, già i materiali impiegati per la sintesi dei dendrimeri sono di natura biologica, attualmente vengono impiegati carboidrati, amminoacidi, lipidi, acidi nucleici, peptidi<sup>67,68,69,70,71</sup>; altri studi prevedono l'impiego di poliglicerolo, melanina e acido citrico<sup>72,73,74</sup>.

Non solo la natura dei materiali è fondamentale per un discorso di biocompatibilità fra i sistemi interagenti, ma da non sottovalutare

sono anche le dimensioni delle molecole interagenti; la famiglia PAMAM ad esempio dalla generazione G1 a G5 non mostra effetti di citotossicità, mentre la G7 presenta potenziali complicazioni biologiche<sup>75</sup>.

Numerosi studi hanno valutato la citotossicità in diverse linee cellulari, sebbene non conclusivi, questi tentativi hanno suggerito che la citotossicità dipende dalla natura del dendrimero, dalla superficie funzionalizzata, dalla generazione, dalla concentrazione, dal tipo cellulare e dalla sua composizione interna. In generale i dendrimeri ammino-terminali inducono più citotossicità rispetto a quelli anionici, probabilmente questo è dovuto all'interazione dendrimero-membrana cellulare che ha come conseguenza la perdita di metaboliti come l'ATP, NADP e NADPH. Uno studio effettuato su PPI funzionalizzati con PEG e con gruppi acetammide neutri ha evidenziato una ridotta citotossicità e una ridotta permeabilità della membrana citoplasmatica di cellule endometriali<sup>76</sup>. Mentre in un altro studio dendrimeri cationici funzionalizzati o con ammine, fosfati e gruppi carbossilici hanno dimostrato un'elevata citotossicità sui melanociti testati. Dall'altra parte, PAMAM funzionalizzati con gruppi carbossilici studiati su cellule HepG2 hanno presentato una citotossicità quasi assente<sup>77</sup>.

Attualmente, la maggior parte degli studi che valutano la citotossicità dei dendrimeri si basano sulla determinazione della vitalità cellulare analizzando la riduzione del MTT, marker in grado di riflettere il metabolismo cellulare. Tuttavia il saggio MTT non è informativo e non fornisce informazioni specifiche sulla sicurezza del dendrimero poiché non permette di valutare con certezza se la morte cellulare è indotta dal dendrimero impiegato, poiché i processi di morte/riparazione cellulare sono multifattoriali<sup>78,79</sup>.

L'impiego dei dendrimeri nel trattamento dei tumori è ancora nella sua fase iniziale sperimentale, dal'altro canto il loro impiego nella diagnosi è a buon punto, tuttavia il passo tra diagnosi e terapia è breve.

# FARMACI ANTITUMORALI

---

### *Introduzione*

Circa due anni fa, *Science*<sup>80</sup> inseriva l'immunoterapia al primo posto tra le 10 maggiori invenzioni scientifiche del 2013, una nuova strategia che sta mostrando risultati promettenti nel trattamento del cancro. L'immunoterapia combatte il cancro come se fosse un'infezione: scatenandogli contro il sistema immunitario, è il rivoluzionario concetto alla base di questo nuovo approccio terapeutico. Se chemioterapia e radioterapia prendono di mira il tumore, infatti, l'immunoterapia va invece ad attivare e rinforzare il sistema immunitario del paziente, inducendolo ad attaccare le cellule malate dall'interno.

Gli approcci all'*immunoterapia* possono essere diversi. Uno dei più promettenti è quello che interviene sui cosiddetti *checkpoint immunitari*, vie metaboliche che inibiscono l'azione delle cellule adibite alla difesa del nostro organismo e che intervengono nel prevenire risposte autoimmuni. Ne è un esempio l'azione della proteina PD-L1<sup>81</sup>, che legandosi con i recettori PD-1 posizionati sulla superficie dei linfociti T inibisce l'azione di quest'ultimi. Alcuni tipi di tumore sfruttano questo meccanismo a loro vantaggio, producendo essi stessi la proteina, così da eludere essi stessi il sistema immunitario. Come riferisce *Nature*<sup>82,83</sup>, pazienti che non hanno mai risposto ad altri trattamenti antitumorali hanno mostrato una regressione a lungo termine della malattia dopo aver assunto farmaci che bloccano PD-L1 o il suo recettore.

Questa però è solo una delle tecniche immunoterapiche a disposizione degli scienziati. Il metodo forse più sfruttato al momento è quello che consiste nell'utilizzo di anticorpi monoclonali<sup>84</sup>, ovvero anticorpi che

vanno a riconoscere molecole (chiamate antigeni) presenti sulla superficie delle cellule, comprese quelle tumorali. La Food and Drug Administration ha già approvato più di una dozzina di farmaci a base di anticorpi monoclonali, come il bevacizumab, commercialmente conosciuto come Avastin, usato per il cancro al colon-retto, al polmone e al rene. In alcuni casi, gli anticorpi possono anche essere associati a molecole per la radioterapia o la chemioterapia, che vengono in questo modo indirizzate in maniera più specifica verso il loro bersaglio.

Un terzo approccio è quello dei vaccini<sup>85</sup> contro il cancro. Si tratta in questo caso di farmaci che hanno lo scopo di immunizzare il corpo contro certi tipi di tumore e prevenirne la comparsa (si pensi al vaccino contro il *Papilloma virus*, che favorisce il carcinoma alla cervice), o che vanno a provocare nel paziente una risposta immunitaria specifica contro le cellule tumorali<sup>84</sup>.

Infine, tra le tecniche di immunoterapia, va ricordato anche l'approccio di terapia genica<sup>86</sup> per le cellule del sistema immunitario. L'idea è quella di ingegnerizzare, per esempio, i linfociti T, facendoli esprimere dei recettori in grado di riconoscere selettivamente antigeni espressi sulla superficie delle cellule tumorali, aumentando così la loro capacità di riconoscerle ed eliminarle.

Rispetto ai trattamenti più radicati, l'immunoterapia offre alcuni vantaggi non trascurabili. Uno dei più significativi è la possibilità di attaccare le cellule tumorali anche in punti non raggiungibili da un chirurgo o in caso di metastasi. La risposta immunitaria, infatti, agisce a livello microscopico e può quindi prendere di mira le singole cellule malate, comprese quelle quiescenti (chemioterapia e radioterapia attaccano selettivamente cellule in divisione). Da non trascurare poi la possibilità di creare farmaci personalizzati, prelevando cellule del sistema immunitario (che possono essere trattate in laboratorio e reintrodotte nell'organismo) o frammenti di tessuto del paziente per isolare specifiche mutazioni di antigeni tumorali. L'immunoterapia inoltre presenta generalmente effetti collaterali più contenuti (anche se non del tutto assenti), dato che non va a danneggiare i tessuti sani che circondano il tumore, e può prevenire la comparsa delle recidive grazie

al meccanismo di memoria immunologica, cioè la capacità del nostro organismo di “ricordare” gli antigeni che hanno provocato una risposta immunitaria e reagire nel caso si ripresentino<sup>87,88</sup>.

Non bisogna dimenticare comunque che i promettenti risultati dei trial clinici condotti negli ultimi anni sono soltanto il primo passo, l'immunoterapia infatti è ancora una tecnica relativamente nuova, che se in alcuni pazienti ha provocato la totale scomparsa di tumori metastatici, in altri è stata un insuccesso.

Quel che è certo è che l'immunoterapia sta suscitando sempre più interesse ed entusiasmo, non solo tra gli scienziati, infatti le industrie farmaceutiche e biotecnologiche dopo un'iniziale scetticismo, stanno dando sempre più fiducia a questo nuovo approccio.

In quest'ottica si inserisce questo lavoro di ricerca, intento a studiare l'interazione esistente tra i farmaci antitumorali di nuova sintesi e le membrane cellulari, ma soprattutto la capacità di questi, superata la membrana, di attivare recettori i TLR7, giocatori chiave nel sistema immunitario innato.

## ***2.1 Imiquimod***

L'Imiquimod<sup>89</sup> (1-(2-metilpropil) -1H-imidazo [4,5-c] idrossi-4-ammina) (nome commerciale Aldara <sup>TM</sup>) è una piccola molecola della famiglia Imidazoquinoline: un gruppo di analoghi nucleosidici che per primi sono stati sintetizzati come potenziali agenti antivirali. Sebbene in vitro non sia stata inizialmente dimostrata una diretta attività antivirale, l'Imiquimod ha però dimostrato di essere in grado di stimolare sia la risposta immunitaria innata sia quella adattativa, e di indurre apoptosi (morte cellulare programmata).

Questa nuova attività biologica ha suscitato l'interesse clinico ed ha portato a numerose sperimentazioni dell'Imiquimod per testarne l'efficacia e la sicurezza per il trattamento di una vasta gamma di patologie epiteliali.

Attualmente, esso è approvato per il trattamento di tre affezioni cliniche quali: verruche anogenitali esterne, cheratosi attinica,



carcinoma basocellulare superficiale. Inoltre in aggiunta a queste applicazioni, un numero di usi off-label sono stati riportati in letteratura. Il suo uso è stato infatti studiato ed approvato in verruche cutanee, herpes genitale, mollusco contagioso, carcinoma squamoso in situ, carcinoma a cellule squamose, carcinoma basocellulare nodulare, melanoma di tipo lentigo maligna, melanoma metastatico, neoplasie intraepiteliali vulvari e vaginali, micosi fungoide, sarcoma di Kaposi, emangioma infantile, granuloma piogenico, leishmaniosi, cicatrici cheloidi e in pazienti immunodepressi.

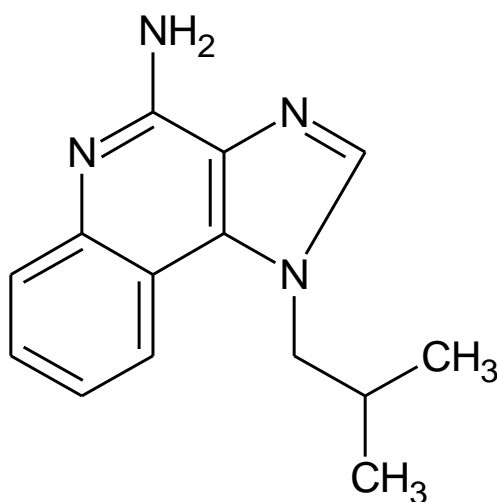
### 2.1.1 Imiquimod: meccanismo d'azione

Poco dopo la scoperta che l'Imiquimod *in vitro* non aveva una diretta attività antivirale, i dati relativi a diverse linee *in vivo*, hanno dimostrato che esso aveva invece un'attività protettiva antivirale indiretta. Nelle cavie, infatti, il farmaco agiva sia come profilattico che terapeutico contro l'infezione primaria da virus dell'Herpes simplex (HSV) quando somministrato per via orale, parenterale, intravaginale o topica. In aggiunta all'attività contro l'HSV, l'Imiquimod riduceva la viremia da Citomegalovirus (CMV) quando somministrato alle cavie 24 ore prima dell'inoculazione del virus.

Nel 1992 è stato dimostrato per la prima volta che l'Imiquimod possedeva anche attività anti-tumorale. Questo effetto è stato inibito dalla somministrazione concomitante di siero anti-interferone  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). E' stato dimostrato in tal modo che l'Imiquimod aveva un effetto antivirale, anche se ciò non avveniva attraverso un meccanismo diretto, come originariamente previsto. Inoltre, è stato dimostrato che esso aveva un'inattesa attività anti-tumorale.

Studi successivi hanno delineato i meccanismi cellulari e molecolari che potrebbero spiegare questo effetto biologico. Tra i modelli proposti per spiegare il suo meccanismo d'azione, quello più fondato è quello che l'Imiquimod induce il rilascio di citochine infiammatorie, innescando in tal modo il sistema immunitario innato. Inoltre, l'Imiquimod stimola l'immunità adattativa, molto probabilmente indirettamente, agendo sulle cellule presentanti l'antigene (APC). In

aggiunta ai suoi effetti sulle immunità innata e adattativa, i dati più recenti hanno dimostrato che l'Imiquimod può anche indurre apoptosi<sup>90</sup>.



*Figura 5: struttura dell'Imiquimod*

### *2.1.2 Imiquimod nell'immunità innata*

I vertebrati possiedono un sistema immunitario che può essere diviso in due componenti: l'immunità innata e quella adattativa<sup>91,92</sup>.

Le cellule della risposta innata sono costituite da macrofagi, neutrofili, basofili, mastociti, eosinofili e cellule natural killer (NK); queste cellule coordinano l'iniziale e rapida risposta agli agenti patogeni. Questa risposta è caratterizzata da una relativa aspecificità. Anziché riconoscere antigeni bersaglio altamente unici, le cellule di questo sistema riconoscono in genere molecole altamente conservate denominate pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Le citochine rilasciate durante la risposta immunitaria innata includono: il fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ), interleuchine quali IL1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, interferoni di tipo I quali IFN- $\alpha$  e chemiochine. Numerosi studi hanno dimostrato la capacità dell'Imiquimod di indurre citochine del sistema immune innato, sia in vitro

che in vivo. Nelle cellule di milza di topo in coltura, l'Imiquimod induce IFN- $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Nei macrofagi di topo, l'Imiquimod stimola TNF- $\alpha$ , come avviene mediante stimolazione con 2'5'-oligoadenilato sintasi, un'enzima regolato da IFN- $\alpha/\beta$ . Nei monociti in coltura di sangue periferico di scimmia, l'Imiquimod induce IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ed IL-8; inoltre i livelli di RNA messaggero di IFN- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 e del gene MxA IFN-inducibile, sono incrementati. Nei monociti in coltura di sangue periferico umano, è aumentata la concentrazione di IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p40, G-CSF, proteine macrofagiche infiammatorie 1- $\alpha$  e 1- $\beta$ , e proteine macrofagiche chemiotattiche. Oltre all'induzione di proteine, Imiquimod ha causato aumenti dei livelli di mRNA di IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  in PBMCs umani. Nei cheratinociti umani e cellule tumorali epidermiche, si è osservata l'induzione di mRNA per IL-6 e IL-8, ma non di IL-1 $\alpha$ <sup>92</sup>.

Questi dati in vitro sono stati supportati da studi in vivo. In cavie, l'Imiquimod ha aumentato i livelli sierici di IFN- $\alpha$  quando somministrato per via orale, per via intravaginale, topica o parenterale. Quando somministrato per via orale o parenterale per topi, il farmaco induce IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Applicando Imiquimod sui fianchi glabri di topi e ratti si è trovato un aumento dell'mRNA di IFN- $\alpha$ , di proteine, e TNF- $\alpha$ . Nelle scimmie cynomolgus, Imiquimod somministrato per via orale ha aumentato i livelli sierici di IFN- $\alpha$  e IL-1RA. Tying ha trattato verruche genitali con Imiquimod topico 5% e analizzato la biopsia cutanea per il virus del papilloma umano (HPV): DNA, mRNA; e produzione di citochine. La reazione a catena della polimerasi (PCR) ha rivelato che le lesioni trattate con Imiquimod sono state significativamente ridotte nel DNA virale, e la trascrittasi inversa (RT)-PCR ha rivelato un aumento di espressione di mRNA di IFN- $\alpha$  e TNF- $\alpha$ .

*Come fa l'Imiquimod ad iniziare questa risposta citichinica a livello molecolare?*  
Una possibilità di interazione è attraverso il recettore Toll-like (TLR), il quale attiva il signalling del fattore nucleare -  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), così come induce l'espressione a valle di IL1, IL6, e IL8. È interessante notare che, sovraespresso induce anche la proteina co-stimolatoria B7,

indicando che i TLRs possono attivare l'immunità adattativa. Il legame tra le Imidazoquinoline e TLR è stato appurato quando Hemmi e altri hanno osservato che i topi deficienti per il TLR7 mostravano una risposta immunitaria attenuata al Resiquimod (R-848), un derivato dell'Imiquimod. Inoltre, topi deficienti per MyD88, una proteina adattatrice nel signalling dei TLR, ha mostrato una risposta immunitaria ugualmente inibita. Jurk e altri hanno dimostrato in vitro che il Resiquimod può attivare sia il TLR7 che il TLR8 nello stimolare NF-kB in maniera dose dipendente<sup>93</sup>.

Questi dati suggeriscono che l'attività immunologica dell'Imiquimod è mediata, almeno in parte, mediante l'attivazione del TLR7 e/o del TLR8, con conseguente attivazione di NF-kB e successiva espressione genica delle sue citochine target pro-infiammatorie.

A sostegno di questi dati, Megyeri<sup>94</sup> e altri identificarono un aumento dei livelli di complessi NF-kB – DNA dopo l'applicazione di Imiquimod a monociti in coltura di sangue periferico umani. Inoltre hanno trovato un aumento dei complessi di un secondo fattore di trascrizione:  $\alpha$ 4F1. Anche un terzo fattore di trascrizione, trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 1 (STAT-1), sembra essere un fattore di trascrizione critico a valle, come dimostrano topi carenti di questa proteina, che mostrano una risposta attenuata all'Imiquimod. Insieme, questi studi identificano STAT-1, NF-kB e  $\alpha$ 4F1 come componenti importanti di segnalazione a valle della risposta all'Imiquimod.

### *2.1.3 Imiquimod nell'immunità adattativa*

La capacità dei TLR di stimolare sia l'immunità innata sia quella adattativa, ha rilevato la possibilità che l'Imiquimod potrebbe anche regolare entrambi i rami del sistema immunitario.

A differenza dell'immunità innata, l'immunità adattativa è caratterizzata per la specificità della sua risposta ad antigeni unici. Il sistema immunitario adattativo consiste di linfociti B e di linfociti T, così come le APC che sono necessarie per attivarli nel tessuto linfoide. Le cellule T-helper (Th) sono quelle maggiormente implicate nel

rilascio di citochine all'interno del sistema immunitario adattativo, e si dividono in due classi in base alle citochine che rilasciano. Le cellule Th1 generalmente attivano risposte cellulari contro patogeni, compresi i macrofagi e le cellule T citotossiche (cellule Tc); questo pathway di citochine consiste nel rilascio di IFN $\gamma$ , linfotossina e TNF- $\beta$ .

Le cellule Th2 attivano una risposta umorale stimolando le cellule B, le citochine di questo sottotipo includono IL-4, IL-5 e IL-13. Anche se l'Imiquimod non ha dimostrato di stimolare direttamente la proliferazione dei linfociti o il rilascio di citochine, ha tuttavia dimostrato di indurre l'immunità adattativa in presenza di APCs<sup>95</sup>. Nel 1999, Wagner e altri hanno riferito che l'Imiquimod potrebbe indurre il rilascio della citochina IFN- $\gamma$  da parte dei Th1 sia in cellule murine che in cellule umane. Le citochine IL-12 e IFN- $\alpha$  erano necessarie per l'induzione di IFN- $\gamma$ . Oltre a indurre IFN- $\gamma$ , l'Imiquimod ha dimostrato di avere un ampio effetto stimolante sulla presentazione dell'antigene<sup>95</sup>.

Nei topi, l'Imiquimod topico ha portato ad una riduzione del numero di cellule di Langerhans (LC) nell'epidermide, e le restanti LC epidermiche erano morfologicamente attivate.

Inoltre, l'Imiquimod ha migliorato la migrazione delle cellule di Langerhans dalla pelle ai linfonodi drenanti adiacenti, sotto stimolo antigenico.

Coerentemente con questi dati murini, studi su cellule di Langerhans umane in coltura hanno dimostrato che queste ultime trattate con Imiquimod potrebbero indurre da 30-300 volte una maggiore proliferazione delle cellule T rispetto al controllo negativo dato da cellule di Langerhans non trattate.

Inoltre, cellule di Langerhans trattate con Imiquimod hanno mostrato l'espressione di numerose proteine co-stimolatorie di superficie, tra cui CD1a, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD40, CD86, e CD80.

Numerosi studi hanno anche riportato l'attivazione di cellule B mediata dall'Imiquimod. In cellule B purificate da topi e uomo, l'Imiquimod ha stimolato la proliferazione e la secrezione di immunoglobuline in assenza di altre cellule del sistema immunitario.

Questi dati suggeriscono che a differenza delle cellule T, le cellule B possono essere attivate direttamente dall'Imiquimod. Bishop e colleghi hanno suggerito che questo effetto può avvenire attraverso il legame e l'attivazione del CD40, un recettore sulla superficie delle cellule B. Essi hanno riferito che il resiquimod può indurre meccanismi di signalling e cambiamenti cellulari simili a quelli attivati dal legame del CD40<sup>96,97</sup>.

#### *2.1.4 Imiquimod nell'apoptosi*

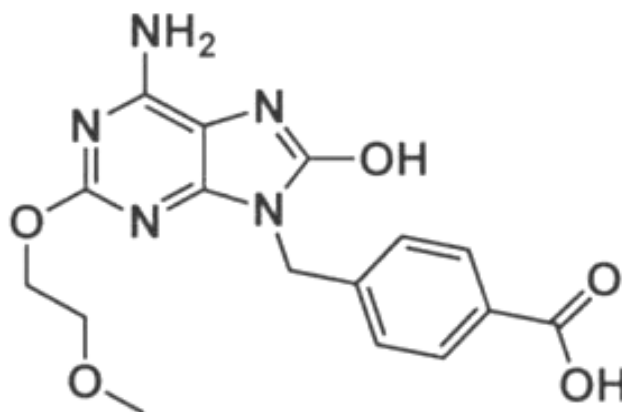
Oltre alla sua ampia attivazione del sistema immunitario, l'Imiquimod ha anche dimostrato dai dati più recenti di possedere attività pro-apoptotica.

Nel carcinoma basocellulare umano (BCC), l'applicazione topica induce un'aumentata espressione del recettore di morte pro-apoptotico CD-95 (Fas). Inoltre, molti gruppi hanno riportato diminuzioni della proteina pro-apoptotica Bcl-2, e la trasfezione di Bcl-2 in cellule tumorali contrasta l'effetto proapoptotico dell'Imiquimod<sup>98,99</sup>. Infine, l'inibizione delle caspasi, a valle di questi eventi di segnalazione, riduce l'apoptosi indotta da Imiquimod, indicando che questa cascata proteolitica è una parte necessaria del meccanismo.

## **2.2 1V209**

Il farmaco 1V209 rappresenta il farmacoforo in grado di legare e di attivare i Toll-like receptors 7. Poiché presenta una certa affinità per i TLR7, il farmaco 1V209 può essere modificato strutturalmente al fine di creare nuove molecole capaci di legare i recettori, ma con proprietà farmacologiche differenti dall'1V209 stesso. Più precisamente, attraverso queste modifiche si cerca di alterare la farmacodinamica del composto con lo scopo di ottenere nuove molecole capaci di indurre una risposta cellulare maggiore oppure con

un tempo di circolazione nel sangue prolungato<sup>100</sup>. Alcuni esempi di questi nuovi farmaci sintetizzati a partire dall'1V209 sono il TMX-202 e il TMX-302.

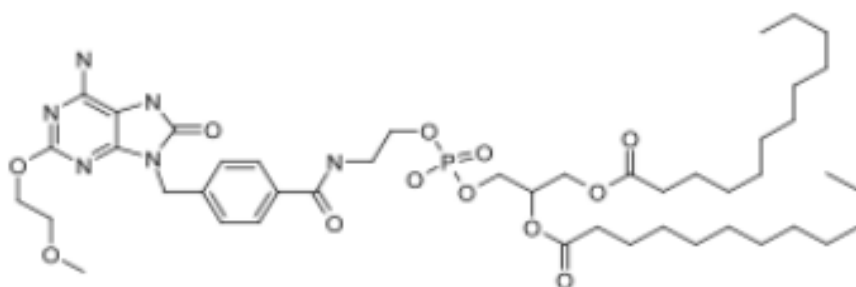


*Figura 6: struttura dell'1V209*

### **2.3 TMX 202**

I farmaci TMX-202 e TMX-302 sono dei modulatori dei TLR7 che derivano dal farmaco foro 1V209 coniugato con code fosfolipidiche e pegilate. Questi farmaci, sviluppati dalla Telormedix S.A. rappresentano molecole di ultima generazione selezionate per studi pre-clinici. Attraverso l'aggiunta di code fosfolipidi che o pegilate si cerca di modificare le proprietà farmacologiche di una molecola o di un farmaco. In questo caso, un aspetto molto importante da considerare è che la forma attiva dei Toll-like receptors 7 è localizzata nel compartimento endosomiale delle cellule. Di conseguenza, la coniugazione degli agonisti dei TLR7 con code fosfolipidiche, facilita la loro endocitosi nelle cellule, favorendo così l'attivazione specifica dei TLR7<sup>101</sup>. La pegilazione, invece, è l'aggiunta ad una molecola, in questo caso ad un farmaco, del glicopolietilenico (PEG), ovvero un polimero non tossico altamente solubile in acqua che viene utilizzato

per veicolare il farmaco nell'organismo<sup>102</sup>. La pegilazione potenzia la solubilità in acqua dei farmaci idrofobici ed aumenta l'emivita del farmaco. E' stato osservato che il tipo di coniugazione è in grado di influenzare l'attività immunomodulatoria di diversi agonisti dei TLR7. In modo più specifico, la coniugazione di un agonista dei TLR7 con code fosfolipidi che può indurre *in vitro* una maggiore produzione di citochine rispetto allo stesso agonista non coniugato. Inoltre, la coniugazione con i fosfolipidi può migliorare la farmacodinamica dell'agonista dei TLR7 *in vivo*. Al contrario, la coniugazione dello stesso ligando dei TLR7 con il PEG, ha ridotto, *in vitro*, la sua capacità di indurre il rilascio di citochine. Tuttavia, l'influenza esercitata sulla produzione di citochine dalle code di PEG sembra dipendere dalla lunghezza di tali code. Infatti, a code pegilate più lunghe sembra corrispondere una maggiore potenza agonistica del farmaco<sup>100</sup>. Il farmaco TMX-202 è un attivatore specifico dei TLR7 coniugato con code fosfolipidiche ed è stato studiato per il trattamento locale del tumore della pelle e del cancro alla vescica.



**Figura 7:** struttura TMX202

Il meccanismo d'azione su cui si basa questo farmaco è simile a quello dell'Imiquimod. Infatti il TMX-202 agisce come agonista dei TLR7, promuovendo la secrezione di citochine e l'attivazione delle varie cellule del sistema immunitario. Lo scopo di questa immunostimolazione è quello di favorire l'eliminazione delle cellule tumorali da parte delle cellule del sistema immunitario.

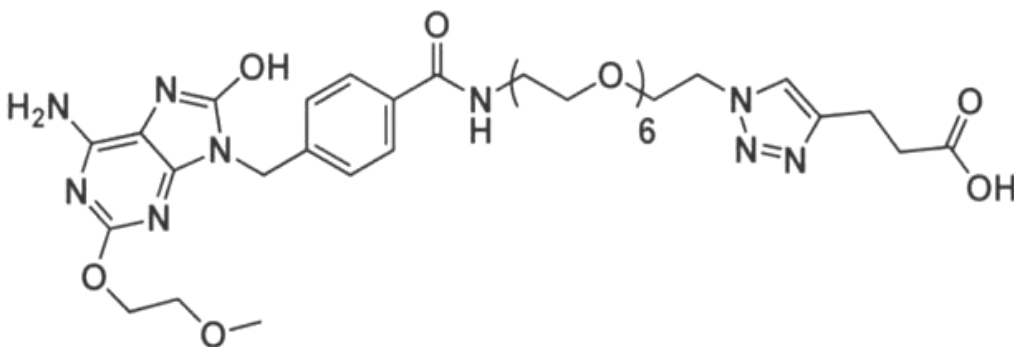


Alcune caratteristiche e proprietà di questo farmaco sono state valutate in uno studio condotto sui cheratinociti<sup>103</sup>.

Nel dettaglio, la farmacodinamica, la potenza, l'efficacia e la tossicità del TMX-202 sono state analizzate e confrontate con quelle dell'Imiquimod. Nonostante *in vitro* la potenza immunostimolatoria del TMX-202 è risultata più alta rispetto a quella dell'Imiquimod, l'applicazione topica del TMX-202 *in vivo* non è stata accompagnata da alti livelli di citochine pro-infiammatorie nei vasi sanguigni. Infatti, le analisi farmacocinetiche hanno mostrato che il TMX-202 è stato meno assorbito nella circolazione sistemica rispetto all'Imiquimod. Di conseguenza, il vantaggio del TMX-202 è quello di avere effetti anti-proliferativi sulle cellule tumorali simili a quelli dell'Imiquimod, ma senza causare un aumento del rilascio di citochine nella circolazione sistemica con possibili effetti collaterali coniugato con code fosfolipidiche il TMX-202 presenta una natura lipofila che garantisce la sua penetrazione locale negli strati idrofobici della pelle, mantenendo alte concentrazioni a livello della zona trattata e riducendo al minimo, di conseguenza, il suo assorbimento sistemico<sup>103</sup>. Inoltre, sempre in questo studio è stato messo in evidenza come il TMX-202 agisce in modo specifico attraverso i TLR7, mentre l'Imiquimod può attivare anche altre vie (ad esempio, i recettori adenosinici) TLR7 indipendenti, causando, molto probabilmente, più effetti collaterali<sup>103,104</sup>. Dunque, il TMX-202, grazie alla sua minore tossicità e ai suoi minori effetti collaterali, potrebbe essere un efficace sostituto dell'Imiquimod nel contrastare patologie della pelle come la cheratosi attinica<sup>103</sup>.

Il farmaco TMX-202, inoltre, potrebbe essere utilizzato come un adiuvante nei vaccini per aumentare le difese contro le malattie infettive ma anche per favorire un'immunizzazione terapeutica contro le malattie non infettive come il cancro. Infatti, se somministrato assieme ad un vaccino, il TMX-202 evocherebbe una risposta immunitaria più forte verso l'antigeno del vaccino, potenziando la risposta cellulo-mediata ed umorale<sup>105</sup>.

Dunque, il TMX-202, stimolando soprattutto le cellule dendritiche, promuoverebbe l'attivazione delle varie cellule del sistema



*Figura 8: struttura TMX302*

Di conseguenza, il TMX-302 impedisce la trasmissione del segnale

utilizzando antagonisti dei TLR potrebbe portare a benefici clinici nel caso di infiammazioni croniche e malattie autoimmuni.

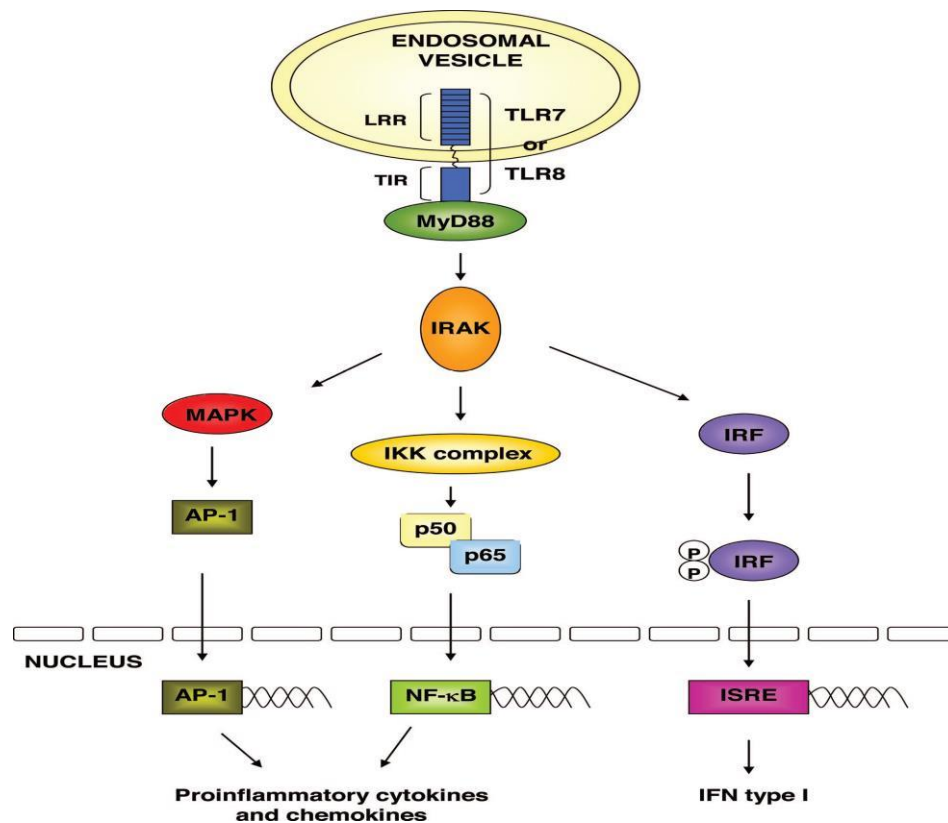
## ***2.5 Ruolo degli agonisti dei TLR7***

Le cellule del sistema immunitario presentano una potenziale capacità di eliminare le cellule tumorali senza arrecare danno alle cellule normali dell'organismo<sup>106</sup>. Diversi studi hanno infatti messo in evidenza la capacità di queste cellule di riconoscere le cellule tumorali nelle prime fasi di sviluppo e di controllarne la crescita, in un processo chiamato immunosorveglianza<sup>107</sup>. L'abilità del sistema immunitario nell'identificare le cellule cancerose risiede nel riconoscimento di specifici antigeni tumorali come, ad esempio, alcune proteine mutate o proteine self espresse in maniera anormale. Tuttavia, la bassa immunogenicità delle cellule tumorali, la quale deriva dal fatto che molti antigeni associati ai tumori sono antigeni self, rappresenta un forte ostacolo<sup>108</sup>. Inoltre, la progressione tumorale spesso è accompagnata da una profonda soppressione del sistema immunitario che impedisce una vera e propria risposta antitumorale<sup>106</sup>. Per cercare di superare tale ostacolo, si è pensato ad una serie di molecole in grado di modulare l'attività delle cellule del sistema immunitario in modo tale da potenziare la risposta immunitaria antitumorale. Tra queste molecole rientrano gli agonisti dei TLR7 come, ad esempio, il TMX-202. I principali meccanismi attraverso cui la stimolazione dei TLR7 può produrre una significativa risposta antitumorale sono:

1. Il potenziamento dell'immunità innata attraverso la stimolazione dei processi antitumorali innati come l'attivazione delle cellule NK, dei monociti e dei macrofagi e la produzione di citochine coinvolte nelle varie attività antitumorali.
2. Il potenziamento dell'immunità adattativa mediante l'attivazione dei linfociti T citotossici (CTL) e dei linfociti T *helper*.

Quando i TLR7 si attivano si assiste al reclutamento, sul loro dominio citoplasmatico TIR, della proteina adattatrice MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88). L'associazione del TLR7 con la proteina MyD88 stimola il legame delle molecole di segnalazione IRAK e dei fattori TRAF che formano un complesso di segnalazione che recluta le proteine TAK1 e TAB1. Tale complesso di segnalazione favorisce l'attivazione delle proteine chinasi MAPK e del complesso IKK. I membri della famiglia delle chinasi MAP fosforilano e attivano il fattore di trascrizione AP-1 mentre il complesso IKK è coinvolto nell'attivazione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B (Figura 9). Entrambi i fattori di trascrizione promuovono la trascrizione dei geni coinvolti nella sintesi delle citochine pro infiammatorie<sup>109</sup>.

Nelle cellule dendritiche, responsabili della produzione della maggior parte degli interferoni di tipo I<sup>110</sup>, l'attivazione dei TLR7 induce la sintesi di queste citochine attraverso un pathway MyD88 dipendente. In modo più specifico, la proteina adattatrice MyD88 forma un complesso con la chinasi IRAK1 la quale fosforila la proteina IRF7 (Figura 9). Una volta fosforilata, tale proteina promuove la trascrizione dei geni dell'INF di tipo I, attivando preferenzialmente i promotori del gene dell'INF- $\alpha$ <sup>111</sup>.



**Figura 9:** Pathways intracellulari innescati dai Toll-like receptors 7.

I pathways di segnalazione pro infiammatori indotti dagli agonisti dei TLRs, attivano la risposta immunitaria innata e giocano un ruolo molto importante nell'attivazione e nella maturazione delle cellule dell'immunità adattativa. La connessione tra immunità innata ed adattativa è dunque parte integrante della segnalazione mediata dai TLRs e deriva dalla capacità dei fattori di trascrizione, come NF- $\kappa$ B e AP-1, di stimolare la produzione di diversi mediatori dell'infiammazione. Il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B, ad esempio, regola la trascrizione di geni che codificano per le citochine, le chemochine, le molecole di adesione e vari immunorecettori<sup>110</sup>. Gli agonisti dei TLRs, di conseguenza, sono in grado di modulare l'attività delle varie cellule del sistema immunitario.

La segnalazione mediata dai TLRs può favorire l'attivazione dei macrofagi, caratterizzata dalla produzione di molecole pro infiammatorie e molecole ad azione anti microbica come l'ossido nitrico<sup>112</sup>. L'esposizione di molecole di adesione e la produzione di fattori chemiotattici, in risposta all'attivazione dei TLRs,

promuove invece il reclutamento leucocitario<sup>110</sup>.

Tuttavia, di fondamentale importanza risulta essere l'attivazione delle cellule dendritiche DC. Tali cellule, in seguito ad attivazione dei TLR7, vanno incontro a maturazione ed iniziano a secernere l'INF- $\alpha$ , importante modulatore della risposta immunitaria, assieme ad alcune citochine proinfiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-12). Gli INF di tipo I prodotti dalle cellule dendritiche sono in grado di attivare le cellule NK le quali, a loro volta, secernono l'INF- $\gamma$ , potenziando l'attività dei macrofagi<sup>110</sup>. Inoltre, le DC rappresentano una delle principali cellule presentanti l'antigene (APC) del nostro sistema immunitario. Una volta attivate, migrano a livello dei linfonodi ed esprimono il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) assieme alle molecole costimolatorie (CD80/86). Ciò innesca l'attivazione dei linfociti T naive. I linfociti T CD8<sup>+</sup> naive si differenziano in linfociti T citotossici (CTL), ovvero cellule effettrici, responsabili della morte diretta di specifiche cellule bersaglio. I linfociti T CD4<sup>+</sup> naive, invece, in base a particolari stimoli, possono differenziarsi in linfociti T *helper* 1 (Th1) e linfociti T *helper* 2 (Th2)<sup>112</sup>. Le cellule Th1 secernono principalmente l'INF- $\gamma$  mentre le cellule Th2 rilasciano varie citochine come IL-4, IL-10 e IL-13.

Gli effetti che gli agonisti dei TLR7 hanno sui vari tipi di cellule del sistema immunitario può essere spiegato, in parte, dal rilascio degli interferoni di tipo I. Infatti gli INF di tipo I (INF- $\alpha$  e INF- $\beta$ ) rappresentano una classe di citochine molto importante non solo nella risposta infiammatoria ma anche in quella antitumorale. Una volta secreti, gli INF di tipo I regolano diverse attività biologiche, come rendere le cellule dell'organismo resistenti alle infezioni virali. Inoltre, questa classe di citochine gioca anche un ruolo importantissimo nella risposta antitumorale agendo sia indirettamente che direttamente. Ad esempio, gli INF di tipo I stimolano l'esposizione delle molecole del MHC, la maturazione delle DC e la produzione dell'INF- $\gamma$ <sup>108</sup>. Per di più è stato osservato che gli INF di tipo I promuovono la proliferazione e differenziazione delle cellule NK e dei linfociti T, il

reclutamento dei macrofagi e la produzione delle molecole costimolatorie<sup>111</sup>. Ma gli INF di tipo I sono anche in grado di agire direttamente sulle cellule tumorali:

- inibiscono la crescita cellulare influenzando l'attività di alcuni geni coinvolti nella sintesi proteica e nella degradazione degli mRNA,
- riducono l'espressione di recettori per i fattori di crescita,
- regolano l'attività di alcune molecole coinvolte nella sopravvivenza cellulare e nell'apoptosi,
- riducono l'espressione di oncogeni come il gene *c-myc*<sup>113</sup>.

Gli agonisti dei TLR7 esercitano un'immunostimolazione che favorisce, come osservato precedentemente, l'attivazione dei linfociti T e delle cellule NK. Questo aspetto è di fondamentale importanza nella lotta del sistema immunitario contro le cellule tumorali. Infatti, i linfociti T citotossici risultano essere degli elementi chiave nell'immunità antitumorale. Queste cellule sono in grado di causare la lisi delle cellule bersaglio<sup>114</sup>. Questa attività citolitica si esplica attraverso la secrezione di granuli di perforina e di granzimi che agiscono sulle cellule target tra cui quelle che presentano specifici antigeni tumorali, ovvero antigeni espressi dalle cellule cancerose e non dalle cellule normali. Questi antigeni possono essere rappresentati da proteine cellulari espresse in maniera anomala (in seguito, ad esempio, ad una mutazione) o da proteine virali presenti nei tumori di origine virale<sup>106</sup>. Invece, i linfociti T *helper*, pur non presentando in genere una marcata attività citotossica, sono comunque molto importanti nella regolazione dell'immunità antitumorale. Infatti queste cellule non solo possono stimolare i macrofagi e i linfociti B, ma cooperano con le cellule dendritiche nell'attivazione dei linfociti T citotossici mediante il rilascio

soprattutto di IL-2<sup>114</sup>.

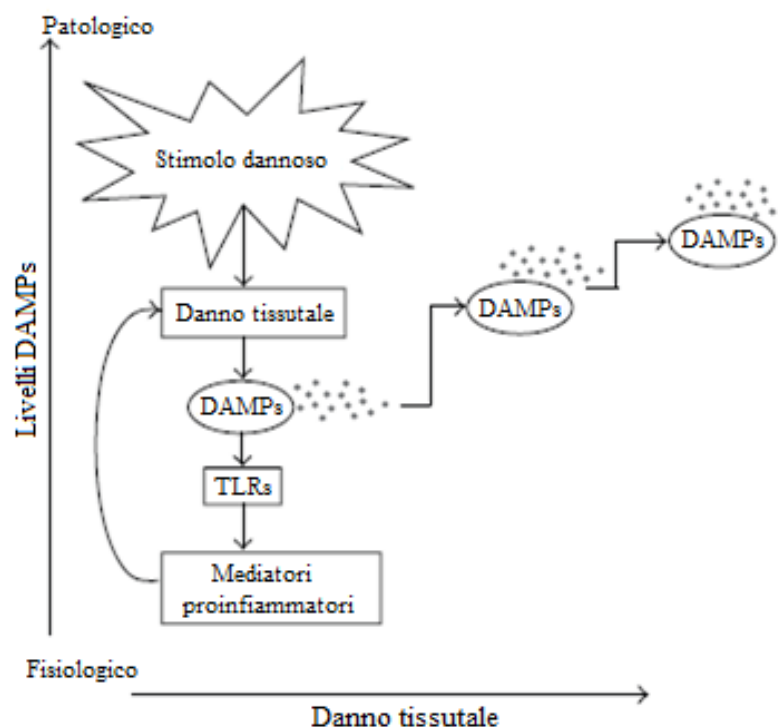
Anche le cellule NK, come i linfociti T, svolgono un ruolo molto importante nell'immunosorveglianza. La maggior parte di queste cellule presenta una potente attività citotossica capace di eliminare le cellule bersaglio attraverso contatto diretto, in un processo definito citotossicità cellulo-mediata dipendente da anticorpi (ADCC)<sup>115</sup>. Le cellule tumorali ad esempio, rappresentano uno dei bersagli principali delle cellule NK in quanto possono presentare molecole stress-indotte e bassi livelli di MHC di classe I<sup>116</sup>. Inoltre, le cellule NK esprimono anche i cosiddetti *death ligand* (come FasL) ovvero dei ligandi che attivano vari recettori di morte presenti sulle cellule bersaglio. Ciò causa l'inizio di una cascata di segnalazione che si conclude con la morte della cellula target per apoptosi.

## ***2.6 Ruolo degli antagonisti dei TLR7***

I Toll-like receptors rappresentano una famiglia di recettori che gioca un ruolo critico nell'attivazione dell'immunità innata e adattativa. Il riconoscimento dei patogeni attraverso i TLRs permette di rilevare il tipo di patogeno, induce una prima ed immediata risposta immunitaria e stimola l'attivazione delle cellule dell'immunità adattativa la cui funzione effettrice sarà appropriata al tipo di patogeno<sup>117</sup>. Tuttavia, l'attivazione dei Toll-like receptors, a volte, può risultare in un'alterata attivazione delle cellule del sistema immunitario. Ciò sembra essere alla base dell'insorgenza di alcune patologie infiammatorie e autoimmuni<sup>118</sup>. Le malattie autoimmuni si sviluppano quando le cellule del sistema immunitario attaccano i tessuti dell'organismo ospite. Sempre di più sono le evidenze che il riconoscimento degli antigeni self può avvenire attraverso i TLRs e questo processo gioca un ruolo molto importante nell'infiammazione sterile e nell'autoimmunità<sup>119</sup>. L'infiammazione sterile è un tipo di infiammazione causata, in genere, da un danno tissutale e non dalla presenza di agenti patogeni<sup>117</sup>. Questo tipo di infiammazione può



essere caratterizzata dalla presenza dei cosiddetti profili molecolari associati al danno (DAMP) che includono molecole endogene intracellulari rilasciate dalle cellule necrotiche o apoptotiche in seguito al danno tissutale<sup>120</sup>. I DAMP sono in grado di legare ed attivare i TLRs. Ad esempio, i TLR7 delle cellule del sistema immunitario possono legare ssRNA endogeno con conseguente aumento dell'espressione dei geni infiammatori. Il rilascio di citochine proinfiammatorie provoca l'attivazione delle altre cellule del sistema immunitario causando ulteriore danno tissutale. Sempre più DAMP vengono rilasciati e la conseguente attivazione dei TLRs può innescare un meccanismo autoalimentante (Figura 10) dove l'aumento del danno tissutale potenzia la risposta infiammatoria<sup>120</sup>. Dunque, questa stimolazione dei TLRs da parte di molecole self può portare all'insorgenza dell'infiammazione cronica e dell'autoimmunità.



**Figura 10:** In seguito al danno tissutale vengono generate molecole endogene (DAMP) che attraverso i TLR stimolano il rilascio di mediatori pro-infiammatori che inducono, a loro volta, ulteriore danno tissutale e rilascio di altre molecole self associate al danno.

Il riconoscimento di acidi nucleici self, mediante i TLR7, gioca un ruolo molto importante nella patogenesi del lupus eritematoso sistemico (SLE)<sup>119</sup>. Il SLE è una patologia cronica di natura autoimmune caratterizzata dal rilascio di autoanticorpi diretti contro componenti self dell'organismo come complessi proteici e acidi nucleici. Gli autoanticorpi generano immunocomplessi che si accumulano a livello di vari tessuti, soprattutto il rene, innescando una risposta infiammatoria<sup>121</sup>. Nella patogenesi del SLE, un ruolo critico è svolto dagli INF di tipo I e dalle cellule dendritiche che producono tali citochine. Diversi fattori esogeni, come ad esempio le infezioni virali, possono dare avvio ad una reazione infiammatoria seguita dal rilascio di molecole endogene, in seguito al danno tissutale. Si vengono così a formare degli immunocomplessi associati a componenti self dell'organismo i quali rappresentano dei potenti induttori endogeni di INF- $\alpha$  che, a sua volta, promuove la differenziazione dei linfociti B<sup>119</sup>. Questo porta ad un ciclo (Figura 11) in cui i linfociti B autoreattivi secernono anticorpi che inducono il rilascio da parte delle DC di altro INF- $\alpha$  che stimola ulteriormente la differenziazione dei linfociti B. Inoltre, le DC si comportano da cellule presentanti l'antigene, attivando i linfociti T autoreattivi ed i neutrofili<sup>121</sup>.

# MALATTIE NEURODEGENERATIVE E PEPTIDE AMILOIDE

---

### *Introduzione*

La più efficace definizione di malattia neurodegenerativa è quella data da Esquirol (1814), con l'aforisma – diventato ormai classico – che recita: “... *il demente è un ricco divenuto povero* ...”. Le malattie neurodegenerative sono dovute alla morte progressiva ed irreversibile dei neuroni e all'impossibilità di comunicare tra loro, sono patologie sempre più frequenti perché legate all'invecchiamento, infatti la maggior parte di queste patologie aumenta soprattutto negli ultimi anni di vita. Erano un tempo patologie relegate a brevi capitoli di cospicui testi nei quali si parlava di *amiotrofia* – cellule nervose che ad un certo punto non funzionano più – negli ultimi 20 anni, però, è cambiato molto lo scenario, sono stati fatti grandi progressi nella comprensione dei meccanismi di queste patologie e in alcuni casi si sono cercate e validate diverse strategie terapeutiche. Tali malattie, vengono classificate basandosi su indicazioni cliniche e genetiche evidenziandone sintomi e caratteristiche; dal punto di vista clinico si sospetta di essere di fronte ad una malattia di tipo neurologico quando si ha un esordio insidioso, cioè quando non si può datare un preciso momento in cui sono iniziati i disturbi, dal decorso lungo e progressivo ed in correlazione con l'età. Quando vengono evidenziate caratteristiche anatomo-patologiche, come il coinvolgimento di determinati sistemi neuronali progressiva rarefazione neuronale, a volte è possibile anche evidenziare reazioni infiammatorie, che spesso sono caratterizzate da deposito di materiale proteico anomalo. Importanti anche le caratteristiche genetiche, alcune rare forme di

malattie presentano un'eredità mendeliana, altre matrilineare, altre sono dovute a specifici polimorfismi genetici<sup>124</sup>.

Nella miriade delle diverse patologie neuronali studiate e attualmente definite tali, di seguito, verrà presa in esame l'AD o *Morbo di Alzheimer*.

### **3.1 Il Morbo di Alzheimer**

*“Immaginate il vostro cervello come una casa illuminata: Ora immaginate che qualcuno spenga le luci una ad una; questo è quello che fa l'Alzheimer.*

*Spegne la luce in una stanza e poi nell'altra e le idee, le emozioni e la memoria si affievoliscono e cessano del tutto. Sfortunatamente, come sanno bene tutti i familiari dei malati, non c'è ancora nessun modo per evitare che le luci si spengano, almeno per ora”*

Madeleine Nash, Time, luglio 2000.

Nel 1901, il Dottor Alois Alzheimer, uno psichiatra tedesco, intervistò una sua paziente, la signora Auguste D., di 51 anni, alla quale mostrò diversi oggetti e successivamente le chiese cosa le era stato indicato. Lei però non poteva ricordarsi. Inizialmente, il dottore registrò il suo comportamento come “*disordine di amnesia di scrittura*”, ma la signora Auguste D., fu la prima paziente a cui venne diagnosticata la malattia di Alzheimer (AD)<sup>125</sup>.

Il Morbo di Alzheimer è una demenza progressiva invalidante, ad esordio prevalentemente senile oltre i 60 anni – ma può manifestarsi anche in epoca pre-senile tra i 30 e i 50 anni – è definita demenza in quanto è caratterizzata da un deterioramento cognitivo cronico progressivo e globale. Demenza che inizia solitamente con perdita lieve, raramente riconosciuta, della memoria, che diventa sempre più grave. Segni comuni sono la confusione, scarsa capacità di giudizio, disturbo del linguaggio, agitazione, allucinazioni. Porta alla morte anche a seguito di malnutrizione e polmonite; la durata in media della malattia è di 8-10 anni, fino ad un massimo di 25 anni<sup>126</sup>. In Italia ne soffrono circa 800 mila persone, nel mondo 26 milioni, secondo uno studio della *Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health* di Baltimora,

USA, con una netta prevalenza di donne, non solo ma fra tutte le demenze quella di Alzheimer è la più rappresentativa, circa 80-85% di tutti i casi di demenza. L'evoluzione della malattia varia da persona a persona a causa di diversi fattori, quali: l'età, le condizioni di vita, lo stato generale di salute, ma in quasi tutti i casi di malattia diagnosticata è possibile, durante il decorso della malattia, distinguere diversi stadi, come:

Stadio Iniziale: con vuoti di memoria, circoscritti a sporadici episodi nella vita quotidiana, disturbi di memoria a breve termine e memoria prospettica, difficoltà nel trovare le parole, inoltre, il malato inizia ad essere taciturno, disorientato specialmente in luoghi sconosciuti e disorientato nel tempo, il malato trova difficoltà nel ricordare data e ora. Le conseguenze di questi sintomi rendono il malato sempre più passivo sul piano intellettuale, inizia a soffrire di paura o depressione. Paradossalmente, il malato manifesta un'attività fisica crescente, si agita ed è incapace di rimanere seduto a lungo, ha costantemente bisogno di muoversi, se si prova ad impedirlo reagisce con aggressività.

Stadio Medio: la malattia evolve e i disturbi diventano più evidenti, a questo stadio i vuoti di memoria colpiscono la memoria episodica retrograda e quella semantica, quella procedurale viene relativamente risparmiata. Le difficoltà nel linguaggio aumentano, il malato non riesce a seguire gli atti quotidiani, come lavarsi, e vestirsi. Il disorientamento nello spazio si manifesta purtroppo anche nell'ambito familiare. A questo stadio il malato è soggetto ad allucinazioni o a deliri, l'agitazione può diventare un vagabondare senza scopo.

Stadio Avanzato: a questo stadio il malato soffre anche di dolori fisici che lo indeboliscono e lo rendono vulnerabile a diverse infezioni. Adesso i vuoti di memoria riguardano anche la memoria a lungo termine, il linguaggio si riduce drasticamente, la maggior parte dei malati cade in un mutismo totale, non riconosce le persone e fa fatica

a capire ed interpretare gli avvenimenti, riscontra delle difficoltà nel nutrirsi, manca di sicurezza nel camminare fino a diventare infermo ed incontinente.

Con analisi microscopiche, la malattia risulta essere caratterizzata da una riduzione del peso e del volume del cervello, dovuta ad atrofia corticale, a livello microscopico e cellulare sono riscontrabili deturpamento neurofibrillare, neuronale e placche senili. Uno dei punti cardini della fisiopatologia dell'AD (*Alzheimer Disease*) è la funzione/struttura alterata di due proteine che portano ad una diffusa distruzione dei neuroni, causata principalmente dalla “ $\beta$  Amiloide”, una proteina che depositandosi tra i neuroni agisce come una sorta di collante, inglobando placche e grovigli neurofibrillari. La “*Proteina TAU*”, che a seguito di frammentazioni perde la sua regione ammino-terminale, costituita da un gruppo  $\text{NH}_2$ , che esercita un'azione tossica provocando la morte della cellula. La malattia, inoltre è accompagnata da una forte riduzione di Acetilcolina, neurotrasmettitore fondamentale per la comunicazione tra neuroni. La perdita delle cellule neuronali e la degenerazione sinaptica caratterizzano le regioni del cervello colpite, in primo luogo l'Ippocampo insieme alle vicine strutture paraippocampali e la corteccia entoriale, tardivamente i lobi temporali e parietali e a volte anche quelli frontali e occipitali<sup>127</sup>.

### ***3.2 “Ipotesi della cascata dell'Amiloide”***

Che cosa accade realmente nel cervello di un malato affetto da AD, è rimasto per molti anni un mistero; il primo passo verso la soluzione del mistero venne fatto alla fine degli anni '80, quando G. G. Glenner<sup>128</sup> purificò e sequestrò nelle placche amiloidi, un peptide di 42 aa, chiamato dallo stesso Glenner: “ $\beta$  amiloide” o “ $A\beta$ ”, derivante dalla proteolisi della proteina di membrana conosciuta come “*Proteina Precursore della Amiloide*” o

“APP”. Tale  $A\beta$  peptide è attualmente ritenuto la causa principale della patologia, grazie alla formazione di placche amiloidi dovute alla sua aggregazione e accumulo. Un'altra ipotesi, molto valida, che ha ricevuto molto successo, per cercare di spiegare cosa provochi il processo di degenerazione neurofibrillare e la perdita di sinapsi, tipici dell'AD, è la variante neuroinfiammatoria della cascata dell'amiloide: *secondo la quale l' $A\beta$  è responsabile indirettamente della fosforilazione della proteina TAU e della degenerazione neurofibrillare*<sup>129</sup>.

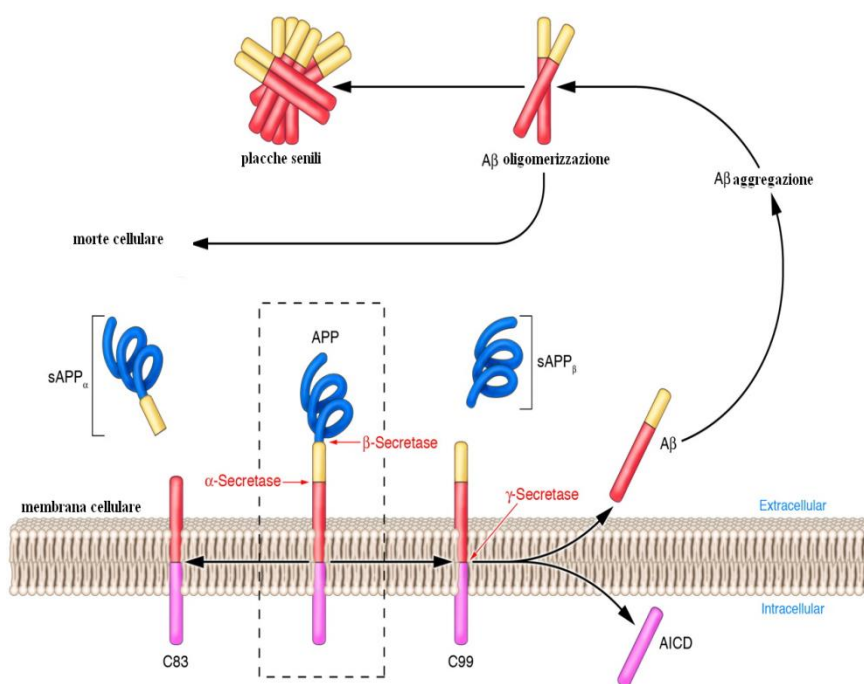
La purificazione e il sequenziamento di  $A\beta$  dalle placche amiloidi presenti nei casi di AD, hanno portato all'identificazione e al clonaggio del gene fautore della sintesi della *Proteina Precursore dell'amiloide*, APP. Il gene di APP è localizzato sul cromosoma 21, contiene 19 esoni, tra i quali l'esone 7, 8 e 15 possono subire splicing alternativo, dando vita a tre diverse isoforme: APP 695, APP 751 e APP700. L'isoforma più corta, APP 695, è espressa esclusivamente nei neuroni, mentre l'APP 751 è presente negli astrociti e nella microglia, l'APP 700 è ubiquitaria<sup>130</sup>.

La sua sintesi proteica ha inizio sui ribosomi liberi, dopo di che viene traslocata nel Reticolo Endoplasmatico dove giunge a maturazione, attraverso la via secretoria viene convogliata al Golgi dove subisce delle modificazioni post-traduzionali<sup>131</sup>. La proteina matura giunge in prossimità della membrana cellulare diventandone parte integrante; essa, infatti è una glicoproteina integrale di primo tipo di membrana, dalle molteplici funzioni biologiche: *favorisce l'adesione cellulare, la migrazione neuronale, la proliferazione cellulare, la crescita dei neuriti, il trasporto assonale, neuroprotezione e traduzione del segnale*<sup>132</sup>.

Una piccola porzione dell'APP viene normalmente degradata per azione di una serie di proteasi, chiamate *Secretasi*, in considerazione del fatto che alla loro azione consegue la liberazione di forme secrete di APP; tali enzimi sono la:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -secretasi, le quali sono sotto il controllo di due altre proteasi, le *Preseneline 1* e *2*. Il taglio dell' $\alpha$ -secretasi promuove il rilascio di un grande frammento ammino-terminale che include il dominio extracellulare di APP, *SAPP* solubile, ed un corto frammento carbossi-terminale, *C83*, legato alla membrana. *C83* è substrato della  $\gamma$ -secretasi che genera il *peptide p3* ed il frammento

*AICD* di 57 residui.  $SAPP\alpha$  sembra agire come un fattore autocrino, neuroprotettivo e forse anche neutrofico<sup>133</sup>. Il pathway dell' $\alpha$ -secretasi poiché avviene all'interno della sequenza del peptide  $\beta$  amiloide, impedendo in tal modo la generazione dello stesso, è stato definito *non-amiloidigenico*.

Mentre il pathway della  $\beta$ -secretasi è stato definito *amiloidogenico* proprio perché tagliando APP all'estremità amino-terminale del peptide  $A\beta$ , genera una forma solubile di APP più corta,  $SAPP\beta$  e un frammento di 99 residui, il  $C99$ . Tale frammento diviene substrato della  $\gamma$ -secretasi liberando il peptide  $\beta$ -amiloide e il frammento  $AICD$ . Il taglio più importante operato dalla  $\gamma$ -secretasi a livello della VAL40, determina la generazione di  $A\beta_{40}$ , l'isoforma di  $A\beta$  più abbondante. Un taglio di 2 residui più a valle, sempre operato dalla  $\gamma$ -secretasi, produce un frammento di  $A\beta$ , di 42 aa, detto,  $A\beta_{42}$ , che rappresenta circa il 10% del totale di  $A\beta$ <sup>134</sup>.



**Figura 11:** meccanismo d'azione delle Secretasi e relativi prodotti proteici

Questi frammenti prodotti dai tagli proteolitici vengono rilasciati al di fuori della cellula e nel caso di  $A\beta_{40}$ , grazie alla loro natura solubile



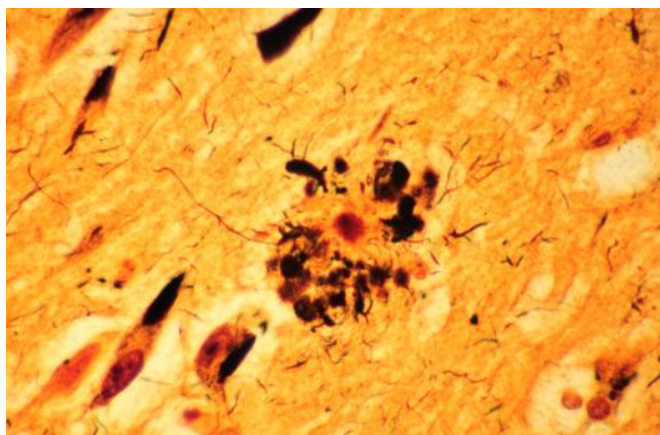
fungono da mediatori di morte apoptotica attivando il ciclo tossico, si ritiene che siano anche dei ligandi specifici per un certo numero di diversi recettori, in grado di modulare le risposte cellulari in seguito di diversi fattori o in grado di indurre un'attività pro-infiammatoria. Diversi esperimenti sostengono una funzione di A $\beta$  come peptide antimicrobico (AMP); i risultati rilevano come A $\beta$  eserciti un'attività antimicrobica nei confronti di otto comuni microrganismi<sup>135</sup>. I frammenti A $\beta$ 42, sono molecole pleiotropiche, di forma elicoidale o a forma di foglietto  $\beta$  ripiegato, da ciò ne segue una struttura molto stabile, tendendo ad aggregarsi e a favorire la produzione di placche senili. Sono comunque peptidi facilmente rilevabili nella maggior parte dei fluidi fisiologici, quali cerebro-spinali<sup>136</sup>.

Mutazioni a carico delle preseneline, delle secretasi e della stessa APP determinano l'accumulo extracellulare di A $\beta$ 42, che sarà essere poi la prima causa della malattia; l'altro evento chiave è l'alterazione della proteina TAU.

### ***3.3 Neuropatologia***

Un aumento nella produzione del peptide A $\beta$ 42, che si verifica sia in presenza che in assenza di cause genetiche, innesca l'accumulo sotto forma di placche dello stesso peptide, il quale, secondo l'ipotesi della cascata dell'amiloide, indirettamente favorisce anche la formazione di grovigli neurofibrillari costituiti dall'intreccio intracellulare di neurofibrille formate dalla proteina TAU anomala. Le placche senili sono distinte in diverse tipologie e varianti morfologiche, da depositi diffusi a strutture sferiche più compatte<sup>137</sup>, nello specifico sono:

- Classiche: accumuli extracellulari, costituiti da un nucleo di  $\beta$  amiloide, circondato da un anello di neuroni distrofici, microglia e astrociti;
- Diffuse: sono una forma preliminare rispetto alle classiche e localizzate in aree cerebrali non sintomatiche dell'AD;
- Bruciate: sono un nucleo isolato di amiloide.



**Figura 12:** Sezione di cervello caratterizzata dalla presenza di placche senili

Sono in generale ammassi di sottili filamenti, di 7/10 nm, che si formano nello spazio extracellulare nel cervello dei malati di AD; sono costituiti da una forma insolubile del peptide e possono presentare un nucleo denso centrale. Una porzione variabile di tali placche contiene anche altre molecole proteiche e non, e può essere associata a cellule non neuronali e a processi neuritici anomali. In queste placche le fibrille di  $A\beta$  presentano una struttura  $\beta$ -sheet che le rende insolubili, resistenti alla degradazione proteolitica e quindi tossiche per i neuroni<sup>138</sup>.

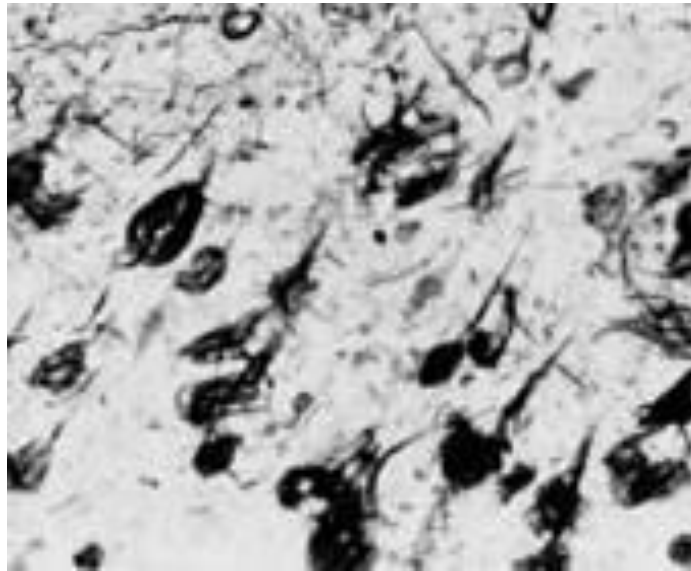
Tali placche senili innescano un processo infiammatorio importante che richiama macrofagi e neutrofili, i quali produrranno citochine, IL e  $TNF\alpha$ ; tutto ciò porta al danno cellulare con alterazione dell'omeostasi ionica, ne risulta uno squilibrio nel bilancio tra Potassio e fosfatasi che porta all'iperfosforilazione della proteina TAU.

Due sono le cause dell'accumulo delle placche<sup>139</sup>:

- 1) forme dominanti della malattia associata alla disfunzione dei geni che controllano il metabolismo della proteina amiloide;
- 2) forme non dominanti della malattia, incluse le forme sporadiche, che coinvolgono i meccanismi della rimozione della  $A\beta$ .

A $\beta$  non solo favorisce la formazione delle placche, ma risulta anche essere associata all'attivazione delle caspasi, è anche in grado di favorire una maggiore sintesi delle proteine pro-apoptotiche, come *Bax*, inducendo neurodegenerazione. È in grado di interferire con il trasporto del canale del Potassio, favorendo una riduzione dello ione citoplasmatico, compromettendo l'omeostasi cellulare. A $\beta$  tende ad accumularsi non solo nei neuroni ma anche nei mitocondri, il cui accumulo induce un aumento della permeabilità mitocondriale, compromettendo il processo ossidativo e aumentandolo. L'amiloide stessa è in grado di generare radicali liberi che provocano danni alle membrane con conseguente degenerazione<sup>140</sup>.

Ulteriori studi hanno dimostrato come nei pazienti insorga un'ulteriore meccanismo patologico: all'interno dei neuroni, una proteina nota come TAU, viene fosforilata in maniera anomala e ciò porta la proteina ad accumularsi in aggregati neurofibrillari. La proteina TAU iperfosforilata si assembla in filamenti elicoidali e si accumula nei citoplasmi dei neuroni, tali *grovigli* appaiono come cellule fantasma, avendo una forma simile a quella dei neuroni morti<sup>141</sup>. TAU è una glicoproteina neuro-specifica, associata ai microtubuli e fa parte del citoscheletro neuronale, che si disgrega progressivamente durante l'apoptosi; il suo corretto funzionamento dipende dal giusto equilibrio tra le sue diverse isoforme e soprattutto dal suo stato di fosforilazione. Nell'AD a seguito di modificazioni post-traduzionali, TAU subisce una fosforilazione anomala risultando più incline a formare aggregati, cioè grovigli, provocando la disintegrazione dei microtubuli ed il collasso del sistema di comunicazione neuronale<sup>142</sup>.



**Figura 13:** *Sezione di cervello caratterizzata dalla presenza di grovigli proteici*

Questi grovigli si trovano principalmente nelle cellule piramidali dell'ippocampo e nei piccoli neuroni piramidali della corteccia fronto-temporale; all'inizio sono matasse intracellulari, quando però diffondono nella neocorteccia provocano degenerazione neuronale. In generale, particolarmente colpiti da questo processo patologico sono i neuroni colinergici, specialmente quelli delle aree corticali e sottocorticali.

La patogenesi della malattia è anche caratterizzata dalla perdita o riduzione di specifici neurotrasmettitori quali Noradrenalina, Dopamina e Acetilcolina<sup>143</sup>.

Dal punto di vista morfologico, un malato di AD, ovviamente a seguito di autopsia, presenta<sup>144</sup>:

- una riduzione del peso e del volume del cervello
- una maggiore dilatazione della cavità ventricolare
- un ampliamento dei solchi e delle scissure a livello della corteccia
- una maggior atrofia



**Figura 14:** Immagine speculare di due cervelli, a sinistra quello sano, a destra il cervello di un soggetto affetto da AD

L'accumulo di  $A\beta$  è l'evento primario nella patogenesi dell'AD, anche se altre caratteristiche di patogenicità, come grovigli, danno neuronale, perdita neuronale, sono in realtà il risultato di uno squilibrio tra la produzione e l'eliminazione di  $A\beta$ .

### ***3.4 Peptide amiloide***

Il peptide  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), è un prodotto del metabolismo cellulare che circola normalmente nei fluidi corporei, ma può precipitare in forma di fibrille sui neuroni dei malati di Alzheimer. Il processo di fibrillogenesi del  $A\beta$  è modulato da diversi fattori tra cui ioni metallici, il pH, i radicali liberi e anche da modificazioni chimiche del peptide stesso.

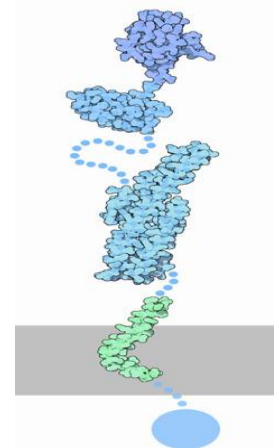
Il peptide fu scoperto quando nel 1984 un gruppo di ricercatori americani riuscirono ad isolare dal materiale amiloide delle placche una corta molecola, costituito da 40 o 42 aminoacidi, cui si diede appunto il nome di peptide  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ).

A fornire il substrato per la produzione di queste placche  $\beta$ -amiloidi e ammassi neurofibrillari è una particolare proteina denominata Amyloid Precursor Protein (APP). Si tratta di una macroproteina di membrana, avente finalità strutturali, parte di questa proteina è immersa nella membrana citoplasmatica con un frammento

denominato A $\beta$  (con 40 o 42 aminoacidi), dotato di tre siti sensibili a enzimi proteolitici selettivi denominati secretasi. La diversa attività di questi enzimi dà diversa produzione di peptide A $\beta$  con conseguente formazione di amiloide. Si deve pensare che la produzione di A $\beta$  e la capacità di smaltimento da parte del neurone siano alla base del suo accumulo o meno e della conseguente citotossicità. Vi sono quindi dei fattori incrementanti la sintesi del peptide (pre-seniline, mutazioni APP, trisomia 21) ed altri che ne favoriscono l'eliminazione (ApoE, anticorpi anti A $\beta$ ).

Il primo passo del processo che porta alla formazione del peptide A $\beta$  consiste nel cleavage del dominio extracellulare N-terminale di APP, che è operato dalla proteasi  $\beta$ -secretasi (BACE, B-Site APP-Cleaving Enzyme). La parte restante della proteina subisce poi l'azione della gamma-secretasi, che attraverso la proteina presenilina taglia la parte residua all'interno della membrana (nel dominio C-terminale), generando così quello che è noto come peptide A $\beta$ .

**Figura 15:** La APP può essere tagliata in una serie di frammenti funzionali dalle secretasi. Queste tagliano su entrambi i lati del piccolo peptide mostrato qui in verde. Il grande pezzo in alto viene poi rilasciato fuori dalla cellula dove aiuta nel controllo della crescita dei nervi, mentre il pezzo più piccolo in basso viene rilasciato all'interno della cellula. Il piccolo peptide che resta nel mezzo è il peptide B amiloide.



La sequenza primaria del peptide A $\beta$ , scritta usando il codice a una lettera per gli aminoacidi, è:

DAEFRHDSGY      EVHHQKLVFF      AEDVGSNKG  
IIGLMVGGVV IA

Una produzione anomala di  $\beta$ -amiloide è la causa di molte malattie neurodegenerative, infatti, sono state identificate un certo numero di mutazioni localizzate sul gene APP in soggetti appartenenti a famiglie nelle quali la malattia di Alzheimer si manifestava con frequenza insolita in età relativamente precoce. Queste mutazioni aumentano la

produzione di A $\beta$ 42 che porta all'aggregazione fibrillare tossica per i neuroni. Le mutazioni del gene APP sono responsabili per il 2-3% dei casi di Alzheimer a trasmissione familiare.

In particolar modo, nel nostro studio, non possedendo l'intera sequenza (1-42) del peptide A $\beta$ , abbiamo utilizzato il frammento A $\beta$  1-28 :

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN

La scelta di questa particolare sequenza amminoacidica deriva dal fatto che da precedenti studi, è stato messo in evidenza che probabilmente è proprio questa sequenza ad essere direttamente coinvolta nella formazione di legami con gli altri peptidi e della conseguente creazione delle placche amiloidi. Infatti la sequenza 1-28 di A $\beta$  presenta gruppi amminici particolarmente reattivi.

### ***3.5 APP (Amyloid Precursor Protein)***

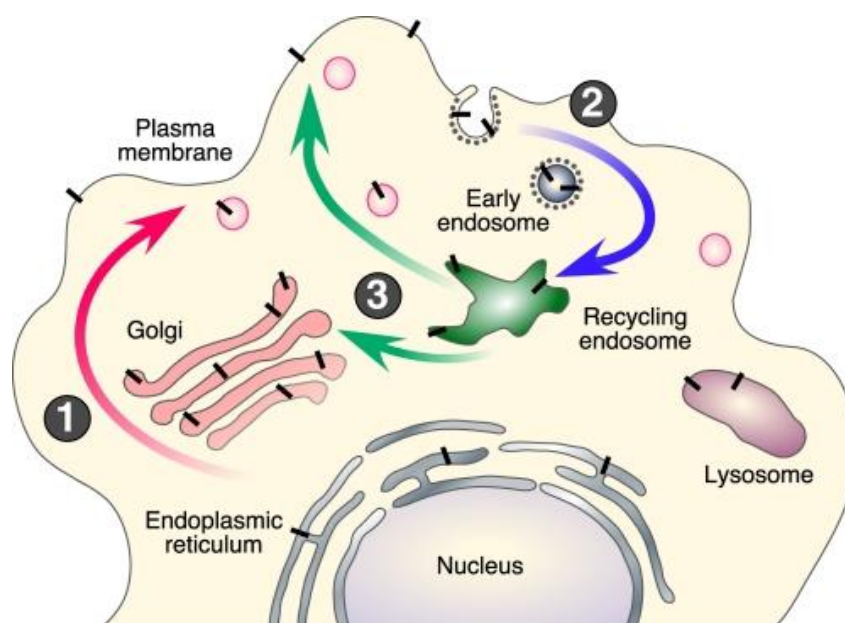
APP è una glicoproteina transmembrana ubiquitaria, quindi presente su tutte le cellule (neuroni, glia, piastrine, cellule linfocitarie, linfoblasti, ecc.) da cui derivano i peptidi amiloidogenetici.

Le funzioni dell'APP sono favorire: l'adesione cellulare, la migrazione neuronale, la proliferazione cellulare, la crescita dei neuriti, il trasporto assonale, neuro-protezione e trasduzione del segnale.

La maggior parte della APP prodotta è degradata durante il processo di trasporto sulla superficie cellulare, ciò è indice di una fine regolazione dell'attività di questa proteina. Il gene che contiene l'informazione per la produzione della APP è situato sul cromosoma 21<sup>103</sup>.

Ci sono tre principali isoforme della proteina a livello cerebrale: APP 695 , APP 751 APP e 770 ; la forma APP 695 è espressa in maniera predominante nei neuroni<sup>164</sup>.





**Figura 16:** Le molecole di APP (barre nere) sono trasportate attraverso la via secretoria costitutiva dove subiscono modificazioni post-traduzionali nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi, poi vengono trasportate alla membrana plasmatica (fase 1). APP è poi interiorizzato mediante endocitosi (fase 2) e trasportato attraverso il sistema di riciclo cellulare degli endociti (fase 3). La via non-amiloidogena si verifica principalmente sulla superficie cellulare dove è presente l' $\alpha$ -secretasi. In alternativa, la via amiloidogena avviene in organelli endocitici dove sono presenti  $\beta$ -secretasi e  $\gamma$ -secretasi<sup>165</sup>

### 3.6 Genesi della malattia

Non esistono categorie più a rischio di ammalarsi di AD, anche se sembra che le persone più istruite corrano un rischio minore di ammalarsi. Confrontando soggetti che presentano la malattia con persone sane, è stato possibile identificare alcuni fattori di rischio:

Età: tra coloro che hanno superato i 65 anni di età si ammalano di Alzheimer circa una persona su venti, mentre al di sotto di tale età la probabilità di ammalarsi è di una su mille. E' importante precisare che nonostante che con l'avanzare dell'età le persone tendano a perdere la memoria, la maggior parte degli ultra ottantenni sono intellettualmente integri, perciò la vecchiaia non è di per sé causa di demenza senile;



Sesso: alcuni studi hanno portato alla luce che la malattia di Alzheimer colpisce maggiormente donne; questo però è anche da ricercare nel fatto che le donne hanno una vita media più lunga, ma anche a causa della riduzione di estrogeni nella menopausa, quindi a parità di età, la malattia dovrebbe essere equamente suddivisa tra i due sessi;

Cause ambientali: tipologia di alimentazione, virus, tossine, basso livello di istruzione;

Traumi cranici: si ritiene che una persona che ha ricevuto un violento colpo alla testa possa essere soggetta all'Alzheimer, soprattutto se questa persona ha già superato i 50 anni, presenta il gene apoE4 nel suo corredo genetico e ha perso conoscenza dopo il trauma;

Fattori genetici: come la familiarità che rappresenta un fattore di rischio, infatti i familiari di un soggetto affetto hanno un rischio di ammalarsi lievemente più alto, ma l'AD non è una malattia ereditabile. Sono state individuate circa 40 famiglie dal 1930, nelle quali la malattia è trasmessa geneticamente con un meccanismo autosomico dominante, in questa forma l'età di insorgenza è assai precoce, tanto da portare i medici a definirla AD pre-senile, distinguendola dalla demenza senile<sup>145</sup>.

L'AD autosomica dominante è indotta da mutazioni dissenso a carico del cromosoma 21 responsabile della sintesi della  $\beta$ -amiloide; mutazioni che portano ad un'abnorme produzione di  $A\beta$ , con conseguente accumulo<sup>146</sup>.

L'aumento notevole della produzione di  $a\beta$  è associato a diversi difetti genetici, quali mutazioni a carico dei geni collocati sui cromosomi 14 e 1, responsabili della sintesi delle proteine Preseniline 1 e 2, mutazioni che portano alla sintesi di proteine mutate non funzionali. Mutazioni a carico del gene SORL1, che normalmente agevola il "recycling" della proteina APP, provocano una ridotta attività della proteina con un aumento del peptide  $A\beta$ ,

responsabile del 10/20% dei casi di AD familiare ad insorgenza tardiva<sup>147</sup>.

E' importante sottolineare che tutti sono soggetti a rischio di contrarre la demenza senile, anche se è stato dimostrato che un gene, presente sul cromosoma 19, rende più possibile il manifestarsi della malattia. Tale gene codifica per la proteina *ApoE*, una proteina plasmatica implicata nel trasporto del colesterolo. Nei cervelli dei soggetti sani ApoE si lega e sequestra  $\alpha\beta$  in modo efficiente eliminandola, a seguito di mutazioni che portano alla formazione dell'isoforma *ApoE4*, risulta invece favorire la deposizione dell' $\alpha\beta$  con conseguente formazione delle placche<sup>148</sup>. Non si tratta di una causa di malattia ma di una maggiore probabilità, infatti solo la metà degli ammalati di AD ha la ApoE nel proprio corredo genico, e non tutti quelli che la possiedono sono ipotetici malati di AD.

### ***3.7 Diagnosi***

La diagnosi certa di demenza avviene soltanto attraverso il riscontro della presenza delle placche amiloidi e delle matasse neurofibrillari ed implica la biopsia o l'autopsia post-mortem. Non esiste attualmente un test specifico per determinare se una persona è affetta da AD o meno, si arriva alla diagnosi per esclusione, dopo un attento esame delle condizioni fisiche e mentali e non grazie al riconoscimento di prove tangibili specifiche della malattia<sup>149</sup>.

La diagnosi della AD prevede tre alternative:

- malattia di Alzheimer possibile: una diagnosi di possibile malattia di Alzheimer è basata sull'osservazione di sintomiclinici e sul deterioramento di due o più funzioni cognitive (per es. memoria, linguaggio o pensiero) in presenza di una seconda malattia che non è considerata la causa della demenza, ma che rende comunque la diagnosi di malattia di Alzheimer meno sicura.

- malattia di Alzheimer probabile: la diagnosi si qualifica come probabile sulla base degli stessi concetti detti sopra, ma in assenza di una seconda malattia.
- malattia di Alzheimer certa: l'identificazione delle caratteristiche placche senili e viluppi neuro-fibrillari nel cervello è l'unica cosa che permette di formulare con certezza la diagnosi di malattia di Alzheimer. Per questa ragione la terza diagnosi, quella di malattia di Alzheimer sicura, può essere formulata soltanto mediante biopsia del cervello, o dopo che è stata effettuata un'autopsia.

In generale la diagnosi prevede:

- anamnesi e visita medica: durante le quali vengono raccolte informazioni sul comportamento del paziente, come difficoltà nel vestirsi, lavarsi. Il malato è sottoposto a visita neuropsicologica per valutare eventuali problemi di memoria, linguaggio, attenzione. Spesso in questa fase iniziale della diagnosi, viene impiegato l'esame MMSE che consiste nel sottoporre il malato a domande del tipo: "Che giorno è? In che città ci troviamo? Come si chiama questo?" (mostrando un orologio). Un'altra parte del test consiste nel far eseguire una serie di operazioni in base ad istruzioni semplici.

- esami di laboratorio: può essere opportuno effettuare una serie di esami di laboratorio (per es. esame del sangue e delle urine) per escludere l'esistenza di altre malattie che potrebbero spiegare la demenza, o di malattie che potrebbero aggravare una pre-esistente malattia di Alzheimer. Inoltre, sono stati sviluppati negli ultimi anni diversi strumenti per osservare l'encefalo, che permettono di fornire immagini del cervello in vivo, rivelando eventuali differenze tra il cervello delle persone sane e quello dei malati di Alzheimer. Questi strumenti permettono di esaminare in modo indolore e sostanzialmente innocuo il cervello di una persona in vita. Per quanto non garantiscano una diagnosi certa di malattia di

Alzheimer, queste tecniche permettono di dare maggior peso a una diagnosi di possibile o probabile malattia.

-esami strumentali:

Risonanza magnetica:

Questo esame consente di ottenere un'immagine della struttura del cervello molto particolareggiata. Sovrapponendo un'immagine ad un'altra eseguita ad alcuni mesi di distanza, è possibile riscontrare i cambiamenti di una determinata parte del cervello.

TAC (Tomografia assiale computerizzata):

Questo esame misura lo spessore di una parte del cervello, che rapidamente si assottiglia nei pazienti affetti da Alzheimer.

SPECT (tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo):

Questo esame può essere eseguito per misurare il flusso del sangue nel cervello; si è riscontrato che tale flusso è ridotto nei malati di Alzheimer, per effetto di una diminuita attività delle cellule nervose.

PET (tomografia a emissione di positroni):

L'uso di questa tecnica è limitato ai centri di ricerca. Può evidenziare cambiamenti nel funzionamento del cervello del malato di Alzheimer; ad esempio un utilizzo anormale del glucosio da parte del cervello<sup>150</sup>.

La ricerca ha comunque fatto grandi passi in avanti nella sperimentazione di nuovi test da utilizzare per una diagnosi sempre più precoce; nel 2004 lo psichiatra Devanger Devanal<sup>151</sup> proponeva un test olfattivo in cui si confrontava la capacità di riconoscere gli odori da parte di anziani sani e individui con una forma lieve-minima di deficit cognitivo, rilevando come questi ultimi, risultando negativi al test, abbiano una maggiore probabilità nei cinque anni successivi di sviluppare la demenza rispetto agli anziani sani e dotati di buon fiuto.

L'olfatto quindi potrebbe diventare un ottimo elemento predittivo della demenza. Un altro test, messo a punto da un gruppo di studiosi australiani, guidati da David Baunce, è in grado di stabilire in pochi secondi se si è predisposti allo sviluppo della demenza con dieci anni di anticipo. L'esame, di cui si legge su Plos ONE, si rivolge soprattutto alle persone tra 44 e 48 anni e sarà facilmente somministrabile “come la misurazione della pressione sanguigna”. Il test, che sarà disponibile non prima dei prossimi due anni, viene effettuato tramite computer in un ambulatorio medico e si basa sull'individuazione di minuscole lesioni nella materia bianca di uomini e donne apparentemente sani: la diagnosi precoce potrebbe consentire ai soggetti coinvolti di adottare misure preventive – come cambiare dieta e aumentare l'esercizio fisico –. Inoltre, spiegano i ricercatori, la rilevazione precoce permetterebbe il monitoraggio negli anni dell'insorgenza delle demenze, tra cui l'Alzheimer, e con l'uso dei nuovi farmaci alcuni soggetti potrebbero non sviluppare mai le patologie. Gli esperti spiegano che ritardare l'insorgenza delle demenze di cinque anni potrebbe portare a dimezzare il numero di persone che muoiono per queste patologie.

### ***3.8 Approcci terapeutici***

Anche se al momento non esiste una terapia che permetta di curare l'Alzheimer, sono state proposte diverse strategie terapeutiche per provare a gestire clinicamente l'AD, tali strategie puntano a modulare farmacologicamente alcuni dei meccanismi patologici che ne sono alla base. Esistono due percorsi terapeutici, uno con medicinali e uno privo, è utile però combinare i due percorsi tenendo conto dello stato del malato.

#### ***3.8.1 Cure con medicinali***

I medicinali attualmente disponibili permettono di attenuare gli effetti della malattia, infatti il trattamento della AD per ora è solo

sintomatico. In primo luogo, basandosi sul fatto che nell'AD si ha una diminuzione dei livelli di Acetilcolina, l'ipotesi è stata quella di ripristinare i suoi livelli fisiologici, questo mediante l'ausilio di farmaci, quali: *Donepezil*, *Taurina*, *Memantina*, tutti inibitori delle acetilcolinesterasi, grazie ai quali si osserva l'aumento dei livelli fisiologici del neurotrasmettitore. Tali medicinali determinano solo un temporaneo miglioramento della qualità della vita del malato, ma non sono in grado di arrestare il progredire della malattia, e la loro efficacia si riduce con l'avanzare della stessa<sup>152</sup>.

Una strategia attuale ha come scopo la riduzione dei livelli di  $A\beta$  nell'encefalo, solubile ed insolubile, o di bloccare l'assemblaggio del peptide nella conformazione patologica. Studi preclinici hanno mostrato che l'immunoterapia può attenuare la neuropatologia amiloide in modelli transgenici del Morbo di Alzheimer.

Nel 1999 hanno inizio gli studi sulla terapia immune: nei topi transgenici non sono stati riscontrati effetti indesiderati e le placche venivano eliminate efficacemente dall'encefalo, tuttavia si è verificato un periodo refrattario a tale terapia<sup>153,154</sup>.

Nel 2002 inizia la sperimentazione clinica su pazienti del vaccino AN1972, che consiste di  $A\beta$  42 fibrillare quale immunogeno e di QS21, un potente polarizzante Th-1 adiuvante. Gli studi clinici di fase 1 mostrarono buona sicurezza e tollerabilità<sup>153</sup>.

E' stata avanzata dunque l'ipotesi di somministrare anticorpi anti- $A\beta$  direttamente al SNC presso i depositi di amiloide. Ci si aspetta una maggiore efficacia rispetto alle strategie di immunizzazione passiva, in cui la maggior parte degli anticorpi erano rivelati in periferia.

Nel 2001 il Dottor DeMattos propose l'"ipotesi di scorrimento periferico" ("peripheral sink hypothesis"). Questo modello supponeva che il sequestro della  $A\beta$  complessata nel sangue contribuisse ad abbassare i livelli di  $A\beta$  libera nell'encefalo e, dunque, alla liquefazione delle placche.

Studi attualmente in corso stanno sfruttando questa ipotesi di approccio.

Nel 2005 è iniziata la sperimentazione per una vaccinazione nasale. Gli studi sono stati interrotti in fase III per mancati effetti benefici.

Nel 2007 il Tramiprosate, composto che era stato progettato per inibire la formazione delle placche di A $\beta$  ha fallito all'ultimo stadio degli studi clinici negli Stati Uniti.

E' in fase di sperimentazione anche un agente dalla strategia innovativa, poiché a sorpresa non è un inibitore della proteina A $\beta$  ma della proteina TAU, la responsabile della formazione dei grovigli neurofibrillari.

Una straordinaria scoperta è stata effettuata dagli scienziati della Mayo Clinic a Jacksonville, Florida, la quale può portare ad un nuovo metodo per curare il morbo di Alzheimer. L'agente inibitore rimuove effettivamente le placche amiloidi, considerate un segno distintivo della malattia, dal cervello dei pazienti. Questa scoperta, pubblicata online sulla rivista FASEB, si basa sulla constatazione che, quando le cellule immunitarie del cervello (microglia) sono attivate dalla proteina interleuchina-6 (IL-6), in realtà, invece di rimuovere le placche, queste le peggiorano. La ricerca è stata effettuata su topi da laboratorio infettati da morbo di Alzheimer.

### *3.8.2 Cure senza medicinali*

Le persone colpite da demenza soffrono per la perdita delle loro competenze. Le terapie senza medicinali diminuiscono il rischio d'isolamento, contribuiscono a salvaguardare la stima che il paziente ha di sé e l'aiutano ad organizzare il suo quotidiano. Queste terapie devono essere utilizzate solo se il malato ne prova piacere<sup>155</sup>.

Si tratta di:

-allenare la memoria: l'allenamento deve essere fornito da professionisti specialmente formati e mira ad aiutare il paziente a gestire il suo quotidiano autonomamente;

-terapia reattiva, come pittura, cucina.

-attività ludiche:cantare, fare ginnastica o passeggiare, se possibile in compagnia di persone che già conoscono, è sicuramente fonte di benessere per loro. Per le persone colpite da demenza è fondamentale essere in compagnia di altre persone!

-musicoterapia:una cura che non costa e che si sta dimostrando sempre più un valido supporto di cura (non certo di guarigione) capace di migliorare e ridurre i disturbi comportamentali

### ***3.9 La chimica del rame***

Il rame è un cofattore cruciale di molti enzimi quali citocromo c e superossido dismutasi, e può pilotare una serie di processi nel corpo che sono essenziali per la vita. Può esistere in ambito biologico in due stati: ridotto Cu (I) e ossidato Cu (II).

Rame è l'elemento numero 29 della tavola periodica. La sua configurazione elettronica è  $3d^{10} 4s^1$ .

Il Cu (I), ha completamente orbitali d completamente riempiti, con 10 elettroni  $3d$  ( 10 ), mentre lo ione rameico (Cu (II)) ha solo 9 elettroni negli orbitali d,  $3d$  ( 9 ) con la presenza quindi di un elettrone spaiato, di conseguenza il rame bivalente (Cu (II)) è paramagnetico e rappresenta lo stato di ossidazione più stabile di rame<sup>156</sup>.

Negli esseri umani adulti, l'assorbimento netto di rame dietetico è di circa 1 mg al giorno.

Al Rame dietetico si unisce circa 4-5 mg di rame endogeno che scorre nel tratto gastrointestinale attraverso vari succhi digestivi. La maggior parte di questo rame ritorna alla circolazione ed ai tessuti, compreso il fegato, minori quantità di rame vengono direzionate su altre parti del corpo come: cuore, muscolo scheletrico, e cervello. Il rame di nuovo assorbito viene trasportato ai tessuti del corpo in due fasi, sostenuto principalmente dai vettori delle proteine plasmatiche (albumina e ceruloplasmina). Nella prima fase, il rame passa dall'intestino al fegato e al rene, nella seconda fase il rame va dal fegato ad altri organi<sup>158</sup>.



Si è scoperto che Cu (II) può essere rilasciato a livello postsinaptico dalle sinapsi glutammatergiche nell'ippocampo, nel sito di deposizione iniziale di A $\beta$  in AD<sup>158</sup>.

Circa 85-95% di rame si lega strettamente alla ceruloplasmina, mentre il resto si lega in maniera meno stretta e viene scambiato tra albumina,  $\alpha$ 2 macroglobulina, amminoacidi, peptidi e diversi micronutrienti. Si farà riferimento alla porzione che si lega alla ceruloplasmina come rame 'legato', e alla porzione che si lega ai composti sciolti come rame 'libero'<sup>157</sup>.

La concentrazione di rame, se superiore al fabbisogno cellulare, media la produzione di radicali liberi e l'ossidazione diretta di lipidi, proteine e DNA. Quindi l'equilibrio tra contenuti intracellulari ed extracellulari di il rame è guidato da sistemi di trasporto cellulari che regolano l'assorbimento, l'esportazione e la compartimentazione intracellulare<sup>156</sup>.

### *3.9.1 La chimica redox del rame*

Il rame è essenziale per la vita, esso gioca un ruolo centrale nel sistema nervoso centrale, nel quale una bassa concentrazione sfocia in sviluppo incompleto, mentre un eccesso è pregiudizievole.

Il rame è un metallo attivo redox e può cambiare il suo stato di valenza in condizioni biologiche.

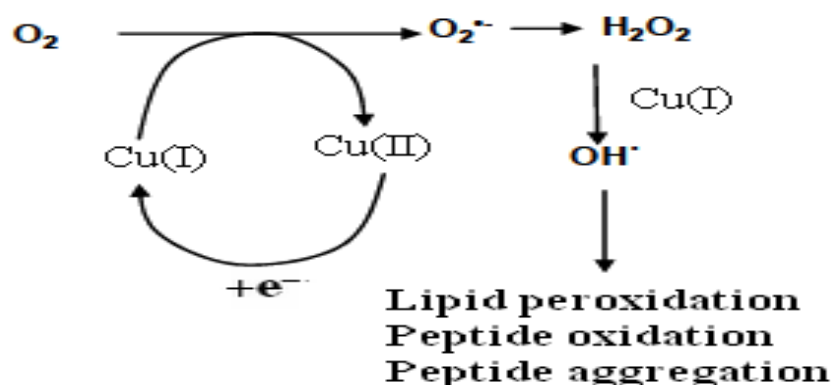
L'unica differenza tra Cu (I) e Cu (II) è la presenza di un elettrone spaiato che promuovere reazioni radicaliche.

L'ossigeno molecolare disciolto nel corpo è suscettibile a reagire con i metalli redox attivi come rame, ciò determina la produzione dei ROS. I superossidi ( $O_2^{\bullet -}$ ) sono un tipo di ROS prodotti nella catena di trasporto mitocondriale e trattati da superossido dismutasi (SOD). SOD è un enzima contenente rame che catalizza la dismutazione di  $O_2^{\bullet -}$  al perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) grazie agli ioni rame SOD subire ossidazione e riduzione.

Il perossido di idrogeno è molto diffuso nelle cellule ed è un agente ossidante o riducendo debole, e generalmente poco reattivo; tuttavia

può reagire con il ferro e rame per formare specie dannose, quali il radicale ossidrile ( $\text{OH}^\bullet$ ), tramite ciclo di Fenton e la reazione di Haber-Weiss.

Così, attraverso il ciclo redox, il rame ha il potenziale per produrre una gamma di specie dannose che possono generare una grande varietà di danno ossidativo nella cellula. L'accumulo di ROS può comportare la modifica di proteine, lipidi e DNA conducono infine alla morte cellulare.



**Figura 17:** schema di  $\text{Cu(II)}$  che induce stress ossidativo .

### 3.9.2 Il rame nel cervello

Il ruolo del rame è stato implicato in varie malattie neurodegenerative come AD, Morbo di Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica<sup>159</sup>.

La barriera emato-encefalica (BBB) è il principale ingresso per il rame al cervello, mentre la barriera emato-fluido cerebrospinale (BSF) regola l'omeostasi di rame nel liquido cerebrospinale (CSF).

Una volta che il rame ha attraversato la barriera BBB / BSF i trasportatori di rame ad alta affinità mediano il trasporto di  $\text{Cu(I)}$  nei neuroni.

### *3.9.3 Ruolo del rame nell'AD*

L'influenza dei metalli nelle malattie neurodegenerative è stata evidenziata dalla constatazione che APP possiede una sequenza di legame selettiva per zinco e rame. APP si lega al rame mediante due domini, uno situato nella regione N-terminale extracellulare e l'altro nel C-terminale, regione intracellulare del peptide  $A\beta$ <sup>160</sup>. Vari studi hanno stato proposto che APP riduce  $Cu^{2+}$  a  $Cu^{1+}$ , promuovendo così la scissione del percorso non amiloidogenico<sup>161</sup>. Una delle principali caratteristiche di AD è la presenza di alterate concentrazioni di ioni metallici nel cervello, come il  $Cu$ <sup>162</sup>, infatti i livelli di rame sono significativamente elevati nei cervelli dei pazienti affetti da AD. Il rame lega  $A\beta$  con alta affinità tramite l'istidina (His, 13 e 14) che interagisce con i residui di tirosina (Tyr 10).

Ci sono due obiezioni comunemente espresse per quanto riguarda il ruolo del rame in AD: la prima è che AD non è associata con un'elevata esposizione al rame ambientale; è importante chiarire questo equivoco, la concentrazione totale di rame all'interno del cervello è potenzialmente più che sufficiente per essere considerata neurotossica. Come conseguenza, il cervello mette in atto efficienti meccanismi omeostatici per mantenere la compartimentazione di ioni metallici, una volta che questi meccanismi vengono compromesse causano malattie neurodegenerative come il morbo di Wilson e di Menkes.

Ci sono prove che suggeriscono che i meccanismi omeostatici di ioni metallici sono alterate nei pazienti con AD, e che quindi AD è caratterizzata da alterate concentrazioni di ioni metallici nel cervello<sup>163</sup>. La seconda obiezione è che l'affinità di  $A\beta$  per  $Cu(II)$  è troppo bassa per riuscire a legare questo metallo nelle sua concentrazione extracellulare; anche questo è un equivoco, poiché i livelli extracellulari di  $Cu(II)$  possono raggiungere i 15 micron, mentre è dimostrato che l'affinità di  $A\beta$  per il  $Cu(II)$  è a livello submicromolare ed è segnalato può essere molto più elevata nelle placche amiloidi.

## CAPITOLO 4

### LINEE CELLULARI

---

#### ***Introduzione***

Una linea cellulare è una coltura cellulare con vita indefinita e considerata immortale, così definita per distinguerla dal ceppo cellulare che non è perenne. Per poter clonare singole cellule o studiarne e modificarne il comportamento, i ricercatori hanno bisogno di colture cellulari capaci di mantenersi per più di cento replicazioni. Tutte le cellule animali, anche se tenute nelle migliori condizioni ambientali e nutrite con tutto quello di cui hanno bisogno, vivono e si replicano solo per un certo periodo di tempo, dopo il quale invecchiano e muoiono, per questo sono dette *colture primarie*. Le linee cellulari continue, invece, sono cellule ‘trasformate’, ossia cellule derivate da tumori oppure cellule che hanno subito una modificazione genetica, una trasformazione oncogena, che le ha rese capaci di crescere indefinitamente. Queste capacità di ‘immortalizzazione’ e di crescita indefinita dipendono dalle specie da cui derivano. La prima linea cellulare umana è la linea delle cellule HeLa, ottenuta nel 1952 da un carcinoma della cervice uterina: la denominazione HeLa deriva dal nome e cognome della donna da cui è stato asportato il tumore. Questa linea cellulare si è dimostrata di valore incommensurabile per la ricerca sulle cellule umane e tuttora rappresenta uno dei modelli di cellula più usati in laboratorio. Nel maggioranza dei casi, le linee cellulari sono indifferenziate anche se alcune possono svolgere funzioni tipiche delle normali cellule differenziate da cui derivano. I mioblasti, precursori delle cellule muscolari, in coltura sono esempio di cellule che, seppur trasformate, continuano a svolgere molte funzioni caratteristiche delle cellule differenziate e specializzate, ad esempio riescono a fondersi e formare miotubi, che ricordano cellule muscolari plurinucleate e differenziate.

Nel presente lavoro di ricerca sono state impiegate diverse linee cellulari:

- i fosfodendrimeri sono stati studiati in relazione alle linee cellulari MRC-5 e HCT-116;
- i farmaci antitumorali sono stati testati sulle linee cellulari HEK Blue hTLR7 e HEK Blue Null1.

## *Seconda linea di ricerca*

### **4.1 Linea cellulare MRC-5**

La linea cellulare di fibroblasti polmonari fetali umani, MRC-5, è comunemente usata nella preparazione dei vaccini. Scoperta e sviluppata da J. P. Jacobs nel settembre del 1996, la MRC-5<sup>164</sup> proveniva da un feto maschio di 14 settimane abortito per “ragioni psichiatriche” da una donna di 27 anni nel Regno Unito. Attualmente è utilizzata nelle tecniche di produzione dei vaccini contro l’epatite A, epatite B, tifo, poliomielite, difterite+tetano+pertosse, vaiolo, rabbia e herpes zoster.

Alcuni di questi virus sono ospite-specifici e per sopravvivere creano stretti legami con le cellule in cui penetrano. Quando un virus matura e si divide, acquisisce alcuni frammenti del DNA delle cellule che lo ospitano. Quando il virus è incorporato nel vaccino porta con sé frammenti del DNA umano delle cellule su cui è stato coltivato. Poiché il nuovo DNA virus/cellula-fetale è almeno in parte della stessa specie del destinatario del vaccino (umano), nel momento in cui il DNA virale modificato viene a contatto col DNA umano del soggetto che ha ricevuto il vaccino, si verifica la cosiddetta ricombinazione omologa del DNA.

Si vengono cioè a formare cellule con un DNA virus/cellula-fetale/vaccinato che possono venire riconosciute come estranee

scatenando una risposta immunitaria volta ad uccidere queste cellule anomale (infiammazione).

Nel 1979 l'Oms ha annunciato ufficialmente l'eradicazione del vaiolo, una malattia infettiva causata da due varianti del virus Variola, Variola maior e Variola minor. Sebbene la malattia sia stata eliminata, sono ancora disponibili dei vaccini con la linea cellulare MRC-5 in modo da proteggere chi non è stato vaccinato nel caso si verifichi un nuovo focolaio.

Nel 2011, invece, la dottoressa Helena Ratajczak<sup>165</sup> ha fatto notare che l'aumento dell'incidenza di autismo in USA avvenne in corrispondenza dell'introduzione della tecnica di coltura che prevede l'utilizzo di cellule fetali per la preparazione in particolare del vaccino MMR e suggerì che i due eventi potrebbero essere collegati. Un picco ulteriore di aumento dei casi di autismo si è registrato nel 1995 quando il vaccino contro la varicella (Varivax) è stato coltivato nelle cellule fetali umane MRC-5. Il Centro Americano per il controllo e la prevenzione delle malattie (CDC) ha comunicato che intende studiare l'autismo come possibile conseguenza clinica delle vaccinazioni, in un progetto di ricerca di 5 anni sulla sicurezza dei vaccini.

Il CDC studierà anche la disfunzione mitocondriale e il potenziale rischio di “danni neurologici” post vaccinali e per questo sta riunendo un team di esperti sulla fattibilità di studiare conseguenze sulla salute come l'autismo su bambini vaccinati e non vaccinati.

Tuttavia, la Food and Drug Administration, conoscendo i rischi della possibile mutagenesi che può manifestarsi utilizzando le linee cellulari embrionali umane, ha regolamentato la quantità minima di DNA umano che potrebbe essere presente in un vaccino, a non più di 10ng. Inoltre la linea cellulare risulta negativa per la trascrittasi inversa e ciò indica l'assenza dell'integrazione di genomi di retrovirus.

Infine in alcune ricerche sperimentali, le linee cellulari MRC-5 sono state utilizzate per lo studio *in vitro* dei meccanismi implicati nel processo di senescenza cellulare con la tecnica del Comet Assay<sup>166</sup>.

## ***4.2 Linea cellulare tumorale HCT-116***

HCT-116 rappresenta una linea cellulare umana del carcinoma al colon ed è comunemente usata per studiare la biologia del tumore<sup>167</sup>. Recentemente negli Stati Uniti è stata condotta una ricerca sulla caratterizzazione della linea cellulare HCT-116 in un trapianto ortotopico.

In questo esperimento le cellule HCT-116 sono state transfettate con la green fluorescent protein (GFP) e iniettate per via sottocutanea in un topo maschio.

Una volta che sono stati stabiliti gli xenotrapianti, essi sono stati asportati e ortotopicamente impiantati in 32 topi maschi. In tutti e 32 animali si è verificata la crescita del tumore e la sua diffusione peritoneale e infine dopo 4 settimane c'è stata la comparsa di metastasi al fegato. L'invasione locale del tumore nella zona dell'impianto è stata confermata in tutte le cavie tramite la colorazione con ematossilina e eosina (H&E). Analizzando le sezioni colorate si è notato che il tumore crescendo invadeva anche la parete intestinale dei topi.

Una volta che si verifica l'invasione, le cellule tumorali cambiano forma e si allungano in modo da occupare più spazio attaccando gli altri tessuti.

Questo processo in cui le cellule cancerogene cambiano la loro forma in seguito alla perdita delle giunzioni di membrana e quindi alla perdita di adesività, è stato definito in letteratura come “transizione epiteliale-mesenchimale” (EMT). Si pensa che quest'evoluzione sia necessaria al tumore per progredire e dare origine a metastasi.

I risultati dell'esperimento sono stati:

nel 47% (15/32) degli animali c'è stata la comparsa di metastasi al fegato e nel 41% (13/32) è stata confermata istologicamente la presenza di metastasi al polmone. In definitiva nel 59% (19/32) erano presenti colonie diffuse di metastasi.

In conclusione il modello ortotopico del cancro al colon descritto in questo studio, utilizzando le cellule HCT-116, ci offre un quadro più completo per le valutazioni terapeutiche precliniche e ci fornisce un

potente strumento per sezionare tutti i meccanismi molecolari coinvolti nella cascata metastatica<sup>168</sup>

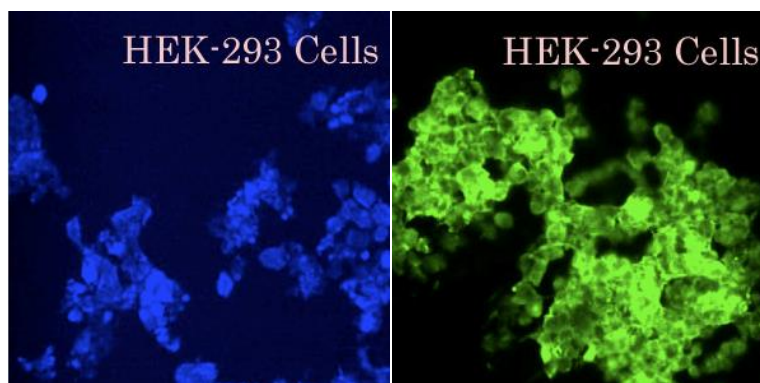
### *Terza linea di ricerca*

#### **4.3 Linee cellulari Hek Blue e Null**

Le linee cellulari HEK Blue hTLR7 e le HEK Blue Null1 sono state ritenute le migliori nell'osservazione dell'interazione dei farmaci in studio sia per quanto riguarda l'interazione con il loro ambiente extra e intracellulare, sia per l'interazione con la loro membrana plasmatica, infatti entrambe le linee cellulari hanno permesso una corretta caratterizzazione e un monitoraggio costante di fenomeni cellulari in presenza dei farmaci.

Le HEK Blue hTLR7 e le HEK Blue Null1 sono state fornite da InvivoGen, azienda americana che provvede alla distribuzione di strumenti innovativi e specifici per la ricerca scientifica.

In particolar modo, le Hek Blue hTLR7 sono state ottenute dalle *Hek 293* (*Human Embryonic Kidney*), una linea cellulare immortalizzata di cellule embrionali renali di origine umana, trasformata con il DNA di adenovirus umano di tipo 5. Questa linea cellulare fu ottenuta per la prima volta negli anni '70, nel laboratorio dell'olandese Alex Van Der Eb, che isolò cellule renali da un feto legalmente abortito. La trasformazione, invece, fu operata da vari scienziati, quali: Frank Graham, Smiley, Russel e Naim nel 1977<sup>169</sup>.





**Figura 18:** *Cellule Hek-293 al microscopio a fluorescenza*

Ampliamente utilizzata come strumento di espressione per proteine ricombinanti, questa linea cellulare ha trovato ampio impiego anche nella produzione di cellule stabilmente transfettate, soprattutto per studi di neurobiologia. Sono utilizzate in esperimenti di transfezione o ricombinazione in cui una volta inserito il gene d'interesse, si può analizzare l'espressione delle sue proteine e le loro caratteristiche biologiche e biochimiche; mentre, come risultato di una sperimentazione, le Hek-293 non lavorano bene come modello di tipiche cellule umane e cellule cancerogene.

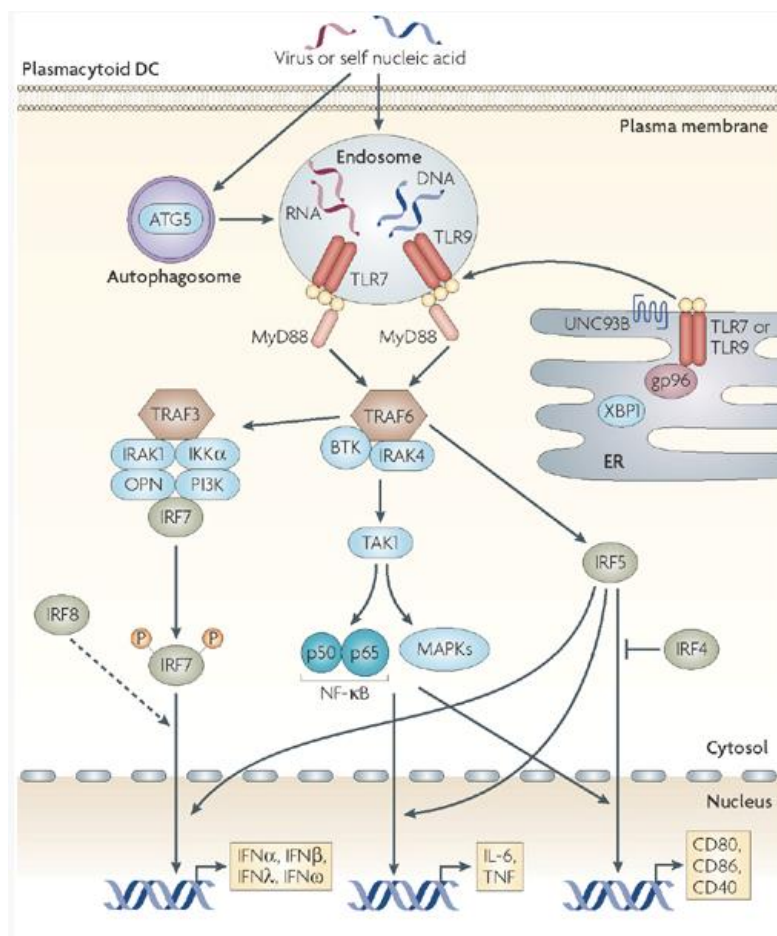
Due sono le peculiarità delle Hek che le hanno rese così vantaggiose, ovvero una veloce riproduzione e una semplice manutenzione, inoltre, possono essere facilmente transfettate utilizzando una vasta gamma di metodi, e traducono con fedeltà le proteine richieste.

Caratterizzate da un cariotipo molto complesso, che esibisce due o più copie di ciascun cromosoma, per un totale di 64 cromosomi, sono descritte come ipotriploidi, in quanto contengono meno di tre volte il numero di cromosomi di una cellula diploide umana. Questa anormalità cromosomica include un totale di tre copie del cromosoma X e quattro copie del cromosoma 17 e del cromosoma 22. La presenza di più copie del cromosoma X e l'assenza del cromosoma Y suggeriscono che il feto originale, da cui Van Der Eb le ha prelevate, era di un soggetto femminile. Più dettagliatamente, sono cellule trasformate mediante l'introduzione dell'adenovirus umano di tipo 5, all'interno del cromosoma 19 della cellula ospite. Una modificazione ampiamente utilizzata per ottenere ricombinanti E1-deleted, cioè vettori in cui la proteina virale E1, coinvolta nella replicazione del DNA virale, viene eliminata.

#### *4.3.1 Hek Blue hTLR7*

Le Hek Blue hTLR7 sono state ottenute dalla cotrasfezione, nelle cellule HEK 293, del gene umano hTLR7 (a cui devono il loro nome), e di un

gene reporter che codifica per l'enzima SEAP (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase). Poichè le Hek293 esprimono livelli endogeni solo di TLR3 e di TLR5, nelle cellule hTLR7, l'introduzione del gene hTLR7 garantisce l'espressione anche dei TLR7. Per questo motivo, le Hek Blue hTLR7 sono particolarmente valide per lo studio dei meccanismi coinvolti nella segnalazione e nel riconoscimento del recettore, andando a monitorare l'attivazione dell'NF- $\kappa$ B (fattore di trascrizione nucleare).



**Figura 19:** Pathways dei TLR7, in cui attivano la migrazione dell'NF- $\kappa$ B nel nucleo

Il recettore TLR7 è filogeneticamente vicino al TLR8 e TLR9 ed è importante in quanto riconosce piccole molecole sintetiche come le loxoribine e gli R848, composti imidazoquinolini. Una volta attivato, il recettore induce la produzione dell'IFN-alfa, TNF-alfa e IL-12; inoltre, alcune sequenze di ssRNA (single-stranded RNA) sono state identificate come ligandi naturali del TLR7, tra cui sequenze derivate

dall'HIV-1 o dal virus dell'influenza, in quanto vanno ad indurre la produzione di citochine proinfiammatorie.

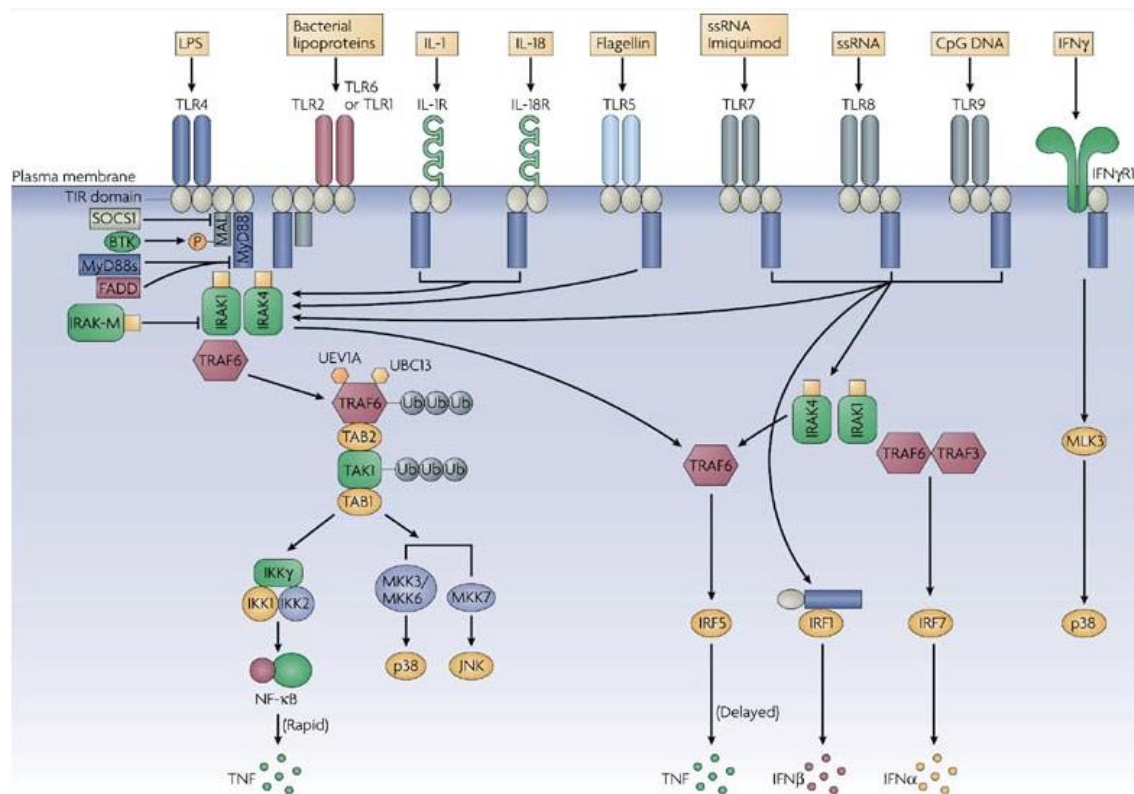
I TLR7 sono dei recettori che fanno parte della famiglia di Toll-like Receptors, tale famiglia è costituita da circa 12 diversi recettori, espressi in maggior quantità dalle cellule del sistema immunitario come i macrofagi, le cellule dendritiche e i monociti<sup>170</sup>. Questi recettori possono essere classificati in diverse sottofamiglie in base alla loro localizzazione cellulare e al tipo di ligando che riconoscono, tra cui il riconoscimento dei pattern molecolari associati al patogeno (PAMPs) e dunque giocano un ruolo principale nell'attivazione dell'immunità innata e adattativa<sup>171</sup>, la quale entra in funzione se l'infezione è più grave, usando anticorpi costruiti su misura e la forza distruttiva dei globuli bianchi per combattere gli invasori.

I recettori Toll-like1, -2, -4, -5 e -6 sono localizzati sulla superficie cellulare e legano principalmente componenti microbiche di membrana, come, ad esempio, lipidi, lipoproteine e proteine.

Mentre i TLR3, -7, -8, -9, coinvolti nel riconoscimento di strutture, come acidi nucleici di virus e batteri, si ritrovano quasi esclusivamente in compartimenti intracellulari, come endosomi, reticolo endoplasmatico, lisosomi e endolisosomi<sup>172</sup>. La particolare localizzazione intracellulare è di fondamentale importanza per impedire reazioni autoimmuni, poichè, come abbiamo già detto i loro ligandi principali sono costituiti da acidi nucleici virali o batterici, quindi per poter essere attivati. C'è bisogno che il materiale genetico estraneo sia veicolato all'interno della cellula ospite. Al contrario, gli acidi nucleici presenti nell'ambiente extracellulare, essendo rapidamente degradati dalle nucleasi, non possono raggiungere i compartimenti intracellulari. Di conseguenza viene impedito il riconoscimento da parte dei TLRs degli acidi nucleici "self", evitando così l'insorgenza di patologie autoimmuni<sup>173</sup>.

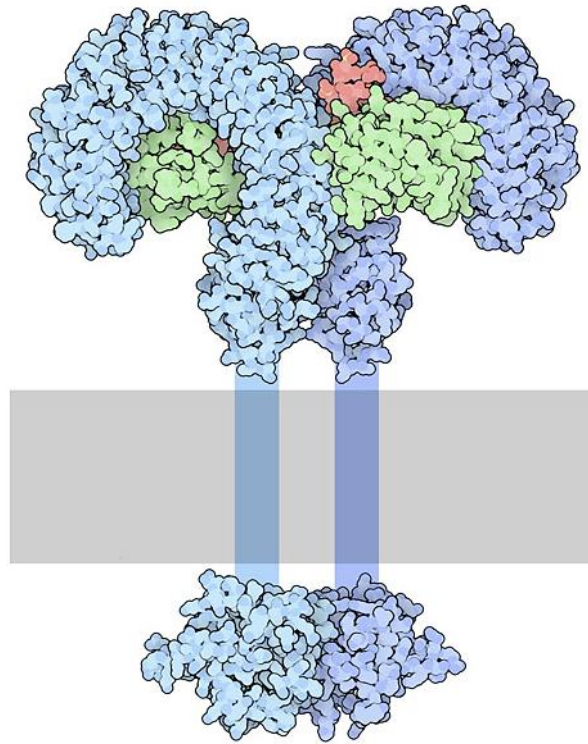
Infine, in seguito al riconoscimento del rispettivo ligando, vengono attivate cascate di trasduzione del segnale che portano ad un aumento dell'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria. In particolar modo, viene stimolata la secrezione di citochine (INF-alfa, TNF-alfa), la fagocitosi e l'attività citolitica delle cellule natural killer<sup>174</sup>.

Più in dettaglio la cascata di segnali è causa di un cambiamento conformazionale del recettore, infatti, come molti recettori della membrana cellulare, i Toll-like receptors trasmettono i loro segnali alla cellula formando un dimero.



**Figura 20:** Alcune vie di segnalazione dei Toll-like receptors

Il recettore attraversa la membrana cellulare, infatti è formata da una grande porzione a ferro di cavallo nella parte esterna della cellula e da un piccolo dominio con attività chinasi nella parte interna. La molecola del patogeno, in questo caso un lipopolisaccaride (*rosso in figura*), viene catturata dalla proteina (*color verde*) formando un complesso che poi lega insieme due copie della porzione a ferro di cavallo che si trovano sul lato esterno della membrana. La formazione del dimero, a questo punto, attiva il dominio chinasi ed innesca la cascata di segnali all'interno della cellula che producono la risposta infiammatoria.

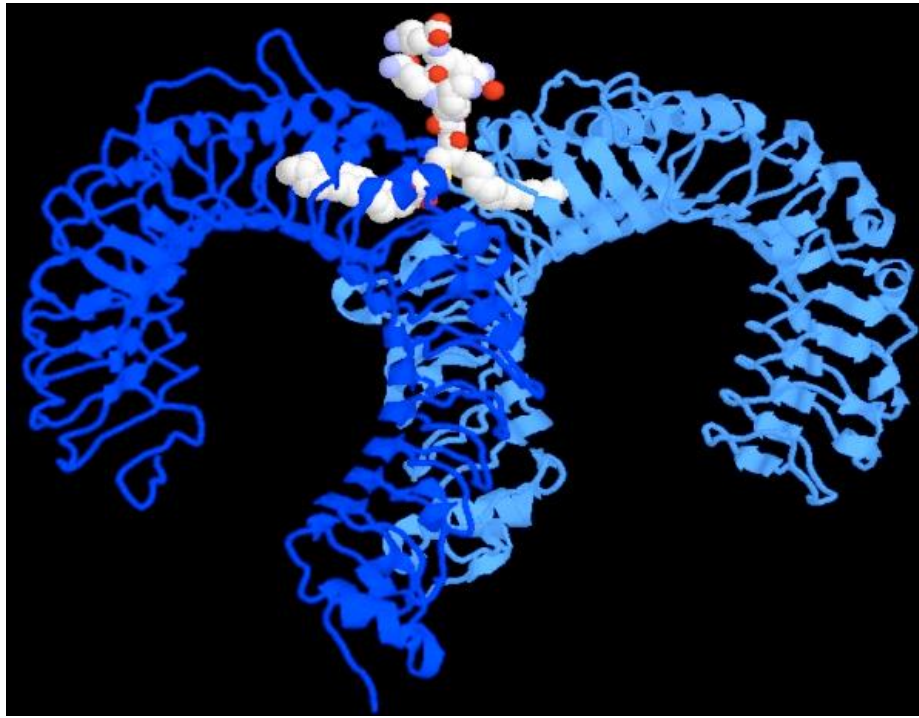


**Figura 21:** *Struttura a ferro di cavallo del TLR7.*

La struttura dei Toll-like receptors, quindi, è caratteristica, in quanto forma un ferro di cavallo, formato da una sequenza di amminoacidi ripetuti, chiamata ripetizione ricca di leucina. Questo motivo è presente anche in altre proteine, in particolare in quelle che legano altre proteine.

In alcuni casi, come nell'inibitore della ribonucleasi, la proteina si lega proprio dove sembra più logico, all'interno della struttura a ferro di cavallo. In generale, però, in questi recettori le molecole bersaglio si legano in una tasca che si trova su un lato del ferro di cavallo. Questo è evidente soprattutto nei recettori Toll-like che riconoscono lipoproteine batteriche come quello mostrato in *figura 4*, dove si vede che le catene lipidiche della molecola bersaglio (sfere grigio chiaro) sono inserite in due profonde tasche che si trovano nelle zone del recettore che si devono avvicinare per formare il dimero<sup>175</sup>.





**Figura 22:** Legame molecole bersaglio (sfere grigio chiaro) nelle tasche del Toll-like receptors.

Il pathway di segnalazione è sfruttato anche dal gene reporter SEAP, cotrasfettato nelle cellule hTLR7. In particolar modo, il gene che codifica per la forma secreta della fosfatasi alcalina embrionale, viene posto sotto il controllo del promotore del gene dell'INF-beta, combinato con cinque siti di legame per i fattori trascrizionali NF-kB e AP-1. Infatti, la stimolazione dei TLR7 con specifici ligandi si traduce nell'attivazione dei due fattori trascrizionali sovracitati e nella trascrizione del gene reporter SEAP, la cui quantificazione è diventata uno strumento vantaggioso nell'impiego di una grande quantità di applicazioni come gli studi sulla funzione dei promotori genici e sulle analisi di espressione genica.

SEAP codifica una forma tronca della fosfatasi alcalina placentare umana (PLAP) in quanto priva del dominio di ancoraggio della membrana. Per questo motivo, la proteina SEAP viene efficientemente secreta dalle cellule hTLR7 nel supernatante della coltura cellulare, offrendo diversi vantaggi rispetto ai reporters intracellulari, inoltre l'interferenza delle fosfatasi alcaline endogene è molto bassa in un terreno di coltura<sup>176</sup>.

Durante la sperimentazione, sono state individuate la presenza e

l'attività della SEAP mediante un kit (HEK-Blue Detection), fornito sempre da Invivogen.

L'*HEK-Blue Detection* non solo contiene i nutrienti necessari per favorire la crescita cellulare, ma presenta un substrato cromogeno specifico per la forma secreta della fosfatasi alcalina embrionale. Infatti, se le cellule crescono secernono la SEAP, la quale idrolizzerà il substrato, conferendo al terreno un colore tendente al rosa/blu, a questo punto è stato possibile osservare l'espressione dell'enzima ad occhio nudo in tempo reale o misurata con uno spettrofotometro (con assorbanza tra i 620-655 nm). Questo è ancora più importante in quanto rappresenta un metodo indiretto per la valutazione dei TLR7, poichè i livelli della SEAP calcolati con il kit sono direttamente proporzionali alla concentrazione intracellulare degli mRNA dell'enzima, quindi ciò corrisponderà ad un aumento dei TLR7 funzionalmente attivi, in quanto recettori a monte della cascata di attivazione.

Per concludere la descrizione delle HEK-Blue HTLR7, nel corso della sperimentazione è necessario utilizzare delle linee cellulari di controllo per essere certi che un determinato ligando vada ad attivare in maniera specifica i recettori TLR7, dato che queste cellule possono essere stimulate da una grande varietà di fattori.

#### 4.3.2 *HEK-Blue Null 1*

Le HEK-Blue Null 1 rappresentano la linea cellulare parentale di diverse HEK Blue TLR e HEK Blue NOD cells (cellule che esprimono i NOD-like receptors, dove NOD sta per: Nucleotide binding Oligomerization Domain). Questa linea cellulare, come le HEK Blue hTLR7 esprime il gene reporter SEAP sotto il controllo del promotore del gene dell'INF-beta, unito a cinque siti di legame dei fattori di trascrizione NF-kB e AP-1, quindi esprimendo la forma secreta della fosfatasi alcalina embrionale, è possibile valutarne l'attività attraverso l'HEK Blue Detection, come visto sopra. Tuttavia, non avendo il gene hTLR7, le cellule Null non esprimono i TLR7,

quindi devono essere stimulate dai loro ligandi specifici, i quali andranno ad attivare NF- $\kappa$ B e AP-1 con la conseguente sintesi della SEAP. Il ruolo delle HEK Blue Null 1, durante la sperimentazione, è stato di rappresentare la linea cellulare di controllo.

#### ***4.4 Terreni di coltura***

Le HEK Blue hTLR7 e le HEK Blue Null1 sono state fatte crescere in due terreni di coltura diversi in quanto sono stati aggiunti diversi antibiotici selettivi. Il terreno di coltura di base era costituito dal terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplementato con 4,5 g/l di glucosio, 10% di siero fetale bovino, 50 U/ml di penicillina, 100 microgrammi/ml di Normocina, 50 microgrammi/ml di streptomicina e 2 mM di L-glutamina. Mentre come antibiotici selettivi abbiamo introdotto, per le HEK Blue hTLR7, Blastidina (10 microgrammi/ml) e Zeocina (100 microgrammi/ml), per le HEK Blue Null 1, solo Zeocina (100 microgrammi/ml). Si può notare che la Blastidina è presente unicamente nel terreno delle cellule hTLR7, il motivo è legato al gene *bsr*. Più dettagliatamente, tale antibiotico è capace di compromettere la sintesi proteica sia nei procari che negli eucarioti e rappresenta un agente selettivo nei confronti di tutte le cellule trasfettate che esprimono il gene *bsr* della resistenza alla Blastidina. Questo gene, nelle HEK Blue hTLR7, è associato al gene hTLR7, dunque la Blastidina è necessaria per far in modo che crescano solo cellule correttamente trasfettate, che esprimono i TLR7.

La Normocina e la Zeocina, invece, sono presenti in entrambi i terreni di coltura per le loro importanti e diverse funzioni. Il primo, infatti, rappresenta un agente antibatterico costituito da tre diversi antibiotici e viene utilizzato per prevenire la contaminazione del terreno da parte di micoplasmi, batteri e funghi. Mentre il secondo, rappresenta un agente selettivo particolarmente utile nell'identificazione e nella selezione di una vasta varietà di tipi cellulari che esprimono il gene *sh ble* (gene della resistenza della Zeocina), il quale è associato al gene per



la forma secreta della fosfatasi alcalina embrionale, quindi permette la selezione delle cellule che esprimono correttamente il gene reporter SEAP17

# SPETTROSCOPIA EPR: TEORIA E PARAMETRI FONDAMENTALI

---

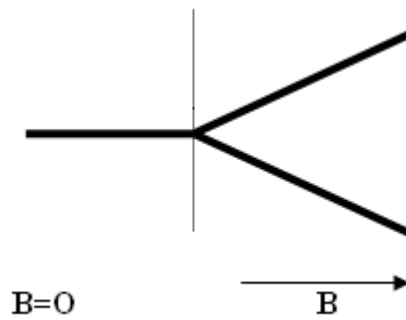
### *Introduzione*

Per la caratterizzazione dei campioni oggetto di questo lavoro sperimentale, è stata utilizzata la tecnica di spettroscopia di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR), scoperta negli anni '40 e che trova applicazione in diversi campi scientifici principalmente nella ricerca biochimica e chimico-fisica.

Studi di meccanismi di polimerizzazione, di cinetica, di reazioni radicaliche, di trasferimento di energia nei cristalli molecolari, di modeling nei sistemi biologici e di catalisi, di caratterizzazione superficiale hanno trovato in questa tecnica un valido supporto. L'analisi degli spettri EPR, infatti, risulta, per molti sistemi di interesse chimico e biologico, il solo metodo di osservazione in grado di evidenziare variazioni nella struttura tridimensionale di un aggregato molecolare o di studiare il comportamento di specifici gruppi funzionali o di valutare la dinamica di specie paramagnetiche e del loro ambiente.

La tecnica EPR sfrutta l'interazione della radiazione elettromagnetica, ed in particolare della componente magnetica, con la materia.

La radiazione utilizzata cade nel campo delle microonde e viene assorbita da parte di un sistema paramagnetico immerso in un campo magnetico esterno statico. L'assorbimento è reso possibile perché il campo magnetico statico provoca una perdita di degenerazione dei livelli di spin elettronico determinando così la comparsa di bande di assorbimento caratteristiche per ogni sistema di studio. La frequenza di queste radiazioni è opportuna e compatibile con le differenze di energia che caratterizzano i livelli di spin.



**Figura 23:** Separazione dei livelli energetici di spin in funzione dell'intensità del campo magnetico applicato

I sistemi che si studiano attraverso questa tecnica sono dei *sistemi paramagnetici*, aventi cioè, un momento angolare di spin elettronico diverso da zero ( $S \neq 0$ ) e tra questi si hanno:

1. RADICALI LIBERI in fase solida, liquida o gassosa
2. IONI DI METALLI DI TRANSIZIONE
3. SOLIDI CON DIFETTI RETICOLARI (vacanze positive o negative possono generare paramagnetismo)
4. SISTEMI CON PIU' DI UN ELETTRONE SPAIATO
5. SISTEMI CON ELETTRONI DI CONDUZIONE (metalli e semi-conduttori)

### ***5.1 Concetti generali di teoria classica***

Come preventivamente accennato, la risonanza paramagnetica elettronica EPR è una tecnica spettroscopica di indagine sulla materia che si basa sull'assorbimento di un fascio di radiazioni microonde da parte di un sistema contenente elettroni spaiati.

Tale assorbimento determina transizioni fra i livelli energetici di spin la cui degenerazione viene rimossa dall'applicazione di un campo

magnetico statico esterno. Un sistema contenente elettroni spaiati possiede un momento magnetico prodotto dal moto di spin.



$i = q/c \cdot t =$  corrente elettrica prodotta dal moto della carica ;  $t = 2\pi r/v =$  periodo di rivoluzione;

$A = \pi r^2 =$  superficie della spira  $\cdot V =$  velocità della carica  $\cdot c =$  velocità della luce

**Figura 24:** Analogia tra il momento magnetico prodotto dalla corrente elettrica che attraversa una spira e quello associato al moto di spin elettronico pensato come rotazione della particella attorno a se stessa

L'effetto dell'applicazione di un campo magnetico statico esterno rimuove l'orientazione casuale di tutti i momenti magnetici elettronici, promuovendo la formazione di livelli energetici discreti.

$$\underline{J} = mvr \underline{n} \quad \underline{\mu} = \frac{q}{2mc} \underline{J} = \pm \gamma \underline{J} \quad \gamma = \text{rapporto giromagnetico}$$

$$E = -\underline{\mu} B_0 \underline{k} = -\mu_z B_0 = \pm \gamma J_z B_0$$

La quantizzazione del momento angolare si traduce nella quantizzazione dell'energia potenziale di interazione.

$$Em_j = \pm \gamma B_0 \hbar m_j$$

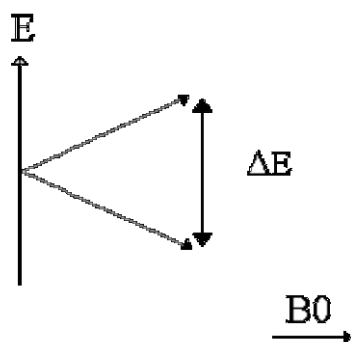
Quindi l'applicazione del campo magnetico  $B_0$  rimuove la degenerazione dei  $2J+1$  stati di momento angolare e governa la distanza tra due livelli energetici consecutivi.

$$\Delta E = |Em_{j+1} - Em_j| = |[\pm \gamma B_0 \hbar (m_{j+1})] - [\pm \gamma B_0 \hbar m_j]| = |\gamma \hbar B_0|$$

Così per il singolo elettrone spaiato otterremo  $\Delta E = \gamma B_0 \hbar$

$$j = s = 1/2$$

$$m_j = m_s = 1/2, -1/2$$

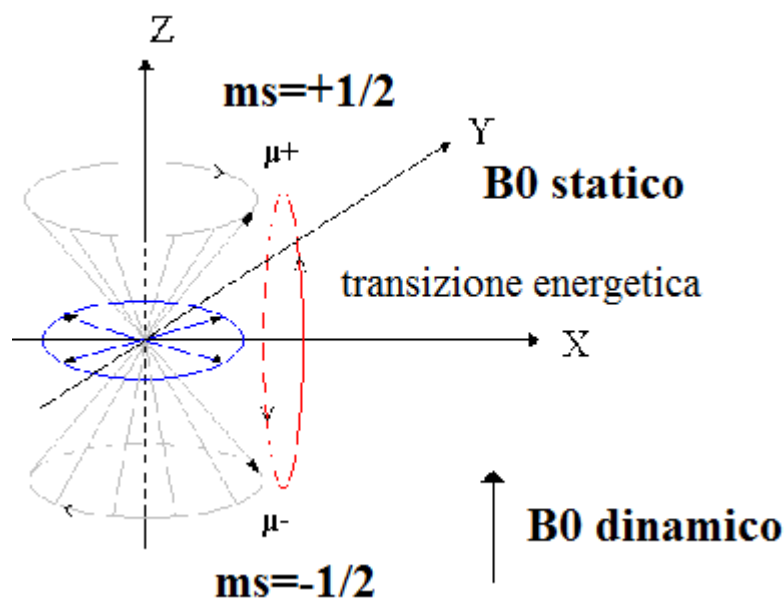


**Figura 25:** Livello energetico Zeeman per il singolo elettrone spaiato in funzione del campo magnetico statico

Da un punto di vista semiclassico, il campo magnetico induce un momento di forza sul dipolo magnetico con cui considero il mio elettrone spaiato determinando un moto di precessione rispetto la direzione z del campo stesso cui corrisponde la frequenza di Larmor con la quale è ancora una volta possibile esprimere il salto energetico quantizzato.

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 = h \nu_0 \quad \text{con } \nu_0 = \text{frequenza di Larmor}$$

Immaginiamo quindi l'invio di una radiazione B1 elettromagnetica tale che il campo elettromagnetico ad essa associato oscilli con una frequenza pari a quella di Larmor.



**Figura 26:** Rappresentazione classica di una transizione energetica fra livelli di spin elettronico indotta dall'invio di una radiazione con frequenza pari a quella di Larmor

La componente in z determinerà semplicemente un ulteriore splitting energetico che andrà a sommarsi dinamicamente a quello sviluppato da B0 mentre le componenti sul piano xy sono quelle utili alla promozione di un altro moto di precessione, ciò che in termini classici possiamo considerare come transizione EPR.

In definitiva sono tali transizioni a produrre i caratteristici spettri EPR, sull'analisi dei quali si basa la tecnica d'indagine spettroscopica.

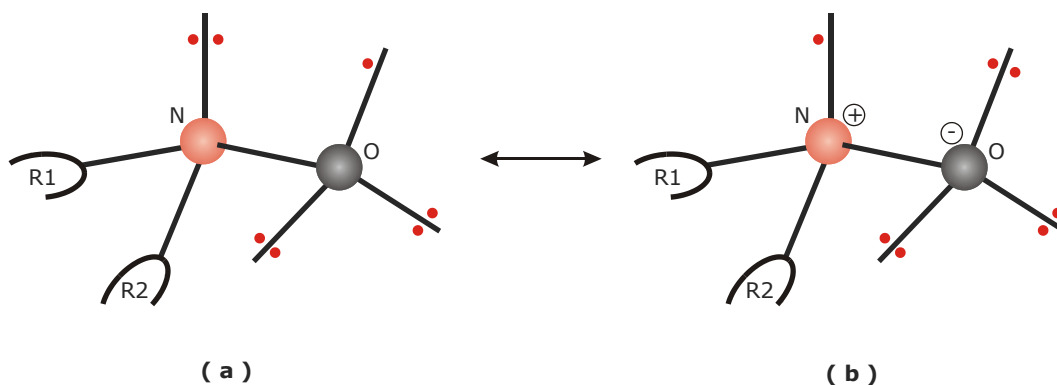
Attualmente, al di là dello studio della singola specie paramagnetica, si valuta il suo assorbimento energetico nel momento in cui essa interagisce con un altro sistema; ciò consente di ricavare informazioni sul sistema stesso o più verosimilmente sull'ambiente che circonda la “sonda paramagnetica” (spin probes).

In alternativa è possibile fissare la specie paramagnetica direttamente al sistema in studio attraverso una tecnica definita marcatura di spin (spin label).

Gli spin-probe sono sonde paramagnetiche che vengono utilizzate per investigare proprietà strutturali e dinamiche<sup>165</sup>. Sono specie che

fungono da “telecamere” in grado di documentare l’intorno chimico locale.

Gli spin-label, invece, sono unità paramagnetiche stabili legate



covalentemente o attraverso un’ interazione di natura fisica permanente con molecole facenti parte del sistema in studio<sup>166</sup>.

Sia che si usi un tipo di sonda o l’altra bisogna tener conto delle seguenti caratteristiche:

- devono essere sensibili all’intorno di cui si vogliono studiare le caratteristiche dinamico-strutturali;
- devono possedere proprietà chimico-fisiche diverse e differenziabili da quelle del sistema in studio;
- non devono modificare l’intorno in cui sono introdotte, per non avere spettri “fasulli”.

La scelta di una tecnica di indagine piuttosto che dell’altra dipende dal tipo di sistema in esame e dalle informazioni chimico-fisiche che si vogliono ottenere.

### *5.1.1 Risonanza paramagnetica elettronica applicata ai radicali nitrossido*

La tecnica EPR non è una tecnica ad ampio raggio in quanto consente esclusivamente di ricavare informazioni dinamico strutturali per una caratterizzazione superficiale dei materiali oggetto di studio.

Il gruppo paramagnetico maggiormente utilizzato in questo lavoro di tesi è il nitrossido, inserito in strutture di vario tipo al fine di poter

valutare, seppur in casi separati, diverse modalità di interazione con i siti superficiali che caratterizzano l'ambiente da sondare.

E' come se dovessi eseguire un ritratto; guardando il soggetto da più punti di vista il risultato sarà sicuramente più affine alla realtà.

La specie paramagnetica in questione, il radicale nitrossido, è descritta dalle due formule limite in cui è mostrata la delocalizzazione dell'elettrone spaiato.

La situazione B è fortemente stabilizzata dalla presenza di un intorno polare, come nel caso di solvatazione con acqua, mentre la situazione in A è più legata ad ambienti di tipo apolare. Tra le due situazioni che abbiamo presentato c'è una variazione per quel che riguarda l'accoppiamento spin elettronico-spin nucleare (accoppiamento iperfine) che si ripercuote a livello di spettro di assorbimento EPR di un valore che definiremo costante di accoppiamento elettrone/nucleo N14.

La valutazione di tale costante ci permetterà quindi di ottenere, come prima informazione, la polarità dell'ambiente sperimentato dalla sonda paramagnetica.

Oltre la polarità, che influisce sulla costante di accoppiamento iperfine (responsabile della formazione delle tre righe d'assorbimento nello spettro EPR in forma derivata del nitrossido) attraverso l'interpretazione di uno spettro EPR con l'ausilio di appositi programmi di simulazione, possiamo ricavare altri parametri caratteristici e significativi quali: la mobilità rotazionale e l'anisotropia di moto (una sorta di orientamento preferenziale di moto) in relazione ad una certa simmetria assiale delle nostre sonde paramagnetiche.

### ➤ Larghezza di riga negli spettri EPR e processi di rilassamento

Prendendo in considerazione il principio di Heisenberg, intuiamo come la riga d'assorbimento energetico nello spettro EPR debba avere una larghezza minima intrinseca legata al tempo di vita finito dello stato eccitato.



$$\Delta E \Delta t \geq \frac{\hbar}{2} \Delta H_{\text{int}} = \frac{\Delta E}{h} \geq \frac{1}{4\pi\Delta t} \quad \Rightarrow$$

Ora possiamo considerare l'Hamiltoniano magnetico del sistema composto da una parte statica ed una dinamica.

$$\hat{H}_{\text{mag}} = \hat{H}_0 + \hat{H}_1(t)$$

La parte statica è formata dalle componenti Zeeman ed iperfini che, come abbiamo visto, contribuiscono a determinare la posizione (frequenza) delle righe spettrali, la parte dinamica invece è costituita dalla radiazione inviata alla cavità EPR  $B_1(t)$  e dai campi magnetici fluttuanti locali.

L'importanza di questi contributi magnetici dinamici risiede nel fatto che essi sono strettamente connessi con quei fenomeni che definiremo come processi di rilassamento, i quali influiscono direttamente sulla larghezza di riga contribuendo a rendere finito il tempo di vita dello stato eccitato di spin in accordo con quanto sancito da Heisenberg.

$$\frac{N\alpha}{N\beta} = \exp\left\{-\frac{g\beta e B_0}{kT}\right\}$$

Analizzando la legge di distribuzione della popolazione dei livelli di spin di Maxwell-Boltzman riportata sopra, si nota che, a partire da condizioni iniziali ( $t=0$ ) in cui lo stato a minor energia  $\beta$  è leggermente più popolato, otteniamo un decadimento esponenziale della differenza di popolazione tra i due livelli  $\beta$  ed  $\alpha$  col raggiungimento infine ( $t \rightarrow \infty$ ) delle condizioni di saturazione del sistema.

In realtà ciò non accade e l'assorbimento microonde si mantiene nel tempo, grazie appunto ai processi di rilassamento che contribuiscono a ripristinare le condizioni iniziali attraverso transizioni spontanee  $\alpha \rightarrow \beta$ .

### 5.1.2 Il vettore magnetizzazione

Quanto finora discusso in merito alla larghezza di riga connessa ai processi di rilassamento può essere spiegato anche in termini di magnetizzazione.

Il vettore  $\underline{M}$  magnetizzazione è dato dalla somma di tutti i momenti magnetici di spin del sistema elettronico, tale vettore è nullo in assenza di campo magnetico statico esterno  $B_0$  mentre sotto la sua influenza acquista un valore  $M_0$  lungo la direzione  $Z$  del campo stesso.

L'effetto del campo magnetico dinamico  $B_1(t)$ , invece, è quello di generare componenti di  $\underline{M}$  sul piano  $XY$  ed annullare la componente  $M_0$  in  $Z$  portando il sistema a saturazione. In questa ottica dobbiamo quindi vedere i processi di rilassamento come dei meccanismi che intervengono ripristinando la magnetizzazione  $M_0$  lungo la direzione  $Z$  (rilassamento longitudinale con costante di tempo  $T_1$ ) e riannullando il vettore  $\underline{M}$  sul piano  $XY$  (rilassamento trasversale con costante di tempo  $T_2$ ).

### 5.1.3 Tipologie di rilassamento per radicali nitrossido

Nel rilassamento longitudinale o spin-lattice accade che, a causa delle componenti  $XY$  di campi elettromagnetici fluttuanti (legati ai moti termici casuali attivi nella materia) con frequenza pari a quella di risonanza, viene promossa una transizione dello spin elettronico che causa appunto il rilassamento dello spin con tempo caratteristico  $T_1$ .

Nel rilassamento trasversale, invece, si ha un'interazione fra gli spin di due elettroni spaiati limitrofi che si scambiano il momento di spin (processo flip-flop) causando un defasamento sul piano  $XY$  con tempo caratteristico  $T_2$ .

Per quel che riguarda i radicali nitrossido, possiamo individuare una netta prevalenza del rilassamento trasversale nel mantenere lontane le condizioni di saturazione; infatti la costante di tempo  $T_2$  è molto inferiore a quella  $T_1$  che caratterizza il rilassamento spin-lattice ed è per questo che la stessa forma di riga sarà principalmente influenzata

da T2. Possiamo quindi visualizzarla come una Laurenziana funzione di T2.

$$L(\nu) = \frac{2T_2}{1 + 4\pi^2 T_2^2 (\nu - \nu_0)^2}$$

L'energia da dissipare, coinvolta nei processi di rilassamento, produce moti rotazionali del reticolo o della sonda stessa; infatti i dislivelli energetici implicati nei processi di rilassamento e nei moti rotazionali sono simili, perciò questi ultimi ben si accoppiano nella dissipazione energetica.

Per il radicale nitrossido il meccanismo più efficace è la modulazione di spin connessa al moto rotazionale assiale della sonda che dissipa l'energia di spin in calore rotazionale verso l'intorno modulando così rispetto ad esso le componenti dei tensori  $A$  e  $g$ .

Le componenti degli spin di elettroni spaiati e dei campi magnetici fluttuanti casualmente con frequenza pari a quella di risonanza sono le uniche in grado di accoppiare con l'elettrone spaiato promovendo la transizione responsabile dell'allargamento omogeneo della riga (di tipo laurenziano).

L'effetto delle componenti statiche lungo  $Z$ , invece, è quello di modificare il divario energetico  $g\beta_e\beta_0$  e i livelli di popolazione a diversa energia quindi ciò che cambia è soltanto la posizione e l'intensità delle righe d'assorbimento.

Nella fattispecie è come se gli spin elettronici equivalenti assorbano radiazioni con frequenza diversa da quella  $\omega_0/2\pi$  stabilita dal modulo di  $B_0$  in virtù appunto delle lievi discrepanze nel campo magnetico effettivo da essi sperimentato, ciò determina un ulteriore allargamento di riga detto inomogeneo che va visto come una distribuzione gaussiana delle laurenziane generate dall'allargamento omogeneo.

#### 5.1.4 Trattazione quantistica della forma di riga: tempo di correlazione ed equazione di Kivelson

Molti fenomeni di rilassamento dei radicali nitrossido in sistemi liquidi si traducono in moti Browniani delle molecole, ossia moti di rotazione e diffusione casuali attraverso il fluido.

Come abbiamo già visto, l'Hamiltoniano del sistema di spin possiamo vederlo costituito da una componente statica (interazione Zeeman + interazione iperfine) e una componente dinamica che descrive l'energia di interazione tra il campo magnetico dinamico efficace ( $B_1(t)$  e campi locali) e lo spin elettronico della molecola sonda.

$$\hat{H}(t) = \hat{H}_0 + \hat{H}_1(t)$$

E' possibile in qualche modo individuare l'interazione della sonda ruotante con il proprio intorno magnetico che fluttua casualmente ed è quanto è stato fatto per la larghezza di riga espressa in funzione di alcuni parametri fra cui il tempo di correlazione  $\tau_c$  significativo della viscosità ed ingombro sterico sperimentato dalla sonda paramagnetica.

Il tempo di correlazione esprime il tempo di vita della configurazione molecolare prima che questa ruoti di  $360^\circ$  riacquistando la configurazione iniziale ed è in pratica una stima della mobilità del radicale sonda.

$$\Delta H \cong \frac{g^2 \beta e^2}{2\pi \hbar^2} \|B_{eff}(t)\|^2 \frac{\tau_c}{1 + \omega_{\alpha\beta}^2 \tau_c^2}$$

Per i nostri radicali nitrossido in condizioni di elevata mobilità è possibile formulare un'espressione che ci descrive la larghezza di riga delle tre componenti iperfini quando essa è legata al solo rilassamento trasversale

$$\Delta H \cong \frac{1}{T_2}$$

Otteniamo l'equazione di Kivelson.

$$\Delta H(mI) = A + BmI + CmI^2$$

In tutti e tre i termini A, B e C c'è la dipendenza dalle componenti di  $\tau_c$  e dei tensori  $A$  e  $g$ .

Il termine A contiene elementi che causano lo stesso tipo di allargamento nelle tre righe, definito appunto isotropo.

Il termine  $BmI$  è quello che causa l'allargamento asimmetrico delle righe negli spettri anisotropi.

Il termine  $CmI^2$ , infine, in virtù della dipendenza quadratica da  $mI$ , interviene allo stesso modo nelle righe laterali simmetriche rispetto alla centrale.

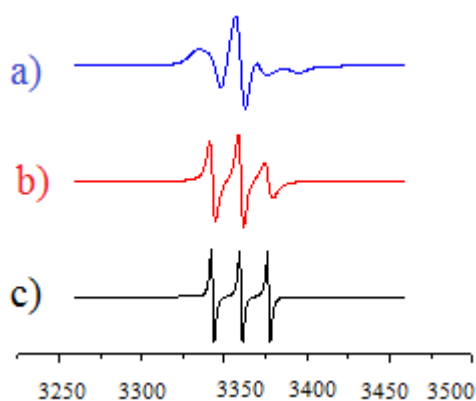
#### *5.1.5 Principali situazioni dinamiche del radicale nitrossido*

In base al valore assunto dal tempo di correlazione, è possibile valutare le principali situazioni dinamiche in cui fotografare la sonda EPR nitrossido e lo spettro d'assorbimento relativo al tipo di interazione con l'ambiente o la superficie del materiale col quale avviene l'interazione.

Parliamo di moti molto rapidi quando il tempo di correlazione assume valori  $\tau_c < 1 \times 10^{-9}$  sec. e nell'equazione di Kivelson i due coefficienti B e C tendono ad annullarsi: segno che la forma di riga è influenzata solo dall'allargamento isotropo.

Quando il valore del tempo di correlazione è  $\tau_c = 1 \times 10^{-9}$  sec., anche i contributi B e C cominciano a farsi sentire nella Kivelson influenzando la forma di riga e determinando un modesto allargamento della prima riga ed un sensibile allargamento (quindi abbassamento) della terza mentre in quella di mezzo si ha un minor effetto, del resto  $mI=0$ .

Per tempi di correlazione compresi tra  $1 \times 10^{-9}$  sec. e  $5 \times 10^{-7}$  sec. si hanno condizioni di moto lento, cominciano a risolversi le anisotropie di  $g$  ed  $A$  e lo spettro non permette più di ricavare direttamente i parametri per i quali è necessario ricorrere all'interpretazione mediante simulazioni al computer.



**Figura 27:** Spettro d'assorbimento EPR, in forma derivata in varie condizioni di mobilità:

- a)  $\tau_c = 5 \times 10^{-9} s$
- b)  $\tau_c = 1 \times 10^{-9} s$
- c)  $\tau_c < 1 \times 10^{-9} s$

Nello spettro in nero la sonda radicalica si muove con un moto molto rapido e possiamo valutare la sola influenza della componente isotropa, in quello in rosso invece parliamo di un moto meno rapido in cui cominciano a manifestarsi i termini B e C, infine lo spettro in blu indica la molecola paramagnetica in condizioni di moto lento dove si risolvono le anisotropie associate ai tensori  $A$  e  $g$ .

Fra gli spettri illustrati sopra non è contemplata la situazione in cui ci troviamo con valori di tempo di correlazione superiori a  $5 \times 10^{-7}$  sec. dove si parla di moto bloccato con completa risoluzione delle anisotropie e quindi delle componenti parallela e perpendicolare dei tensori  $A$  e  $g$ . In tal caso assisteremo a differenti modalità di rilassamento, a seconda della direzione considerata, dato che rotazioni attorno l'asse  $z$  sono favorite rispetto a quelle attorno agli assi  $x$  e  $y$ .

Di conseguenza sarà possibile valutare un tempo di correlazione parallelo per la rotazione attorno all'asse  $z$  e uno perpendicolare per i moti attorno agli assi che individuano il piano  $xy$  ( $\tau_{//} > \tau_{\perp}$ ).

Supponendo che i moti dell'intorno della sonda siano di natura Browniana, è possibile esprimere il tempo di correlazione in funzione del coefficiente di diffusione rotazionale dalla cui formulazione capiamo come  $\tau_c$  sia da connettere proporzionalmente alla viscosità dell'intorno o mobilità della sonda.

### 5.1.6 *Spin probe*

È possibile distinguere le sonde paramagnetiche in: Spin labels e Spin probes. La sostanziale differenza tra i due tipi è che le spin labels sono covalentemente attaccate al sistema d'interesse mentre nessun tipo di legame esiste tra le spin probes ed il materiale in esame. In linea di massima, quest'ultime sono più idonee nello studio di macromolecole e assemblamenti supramolecolari, in seguito alle loro strutture governate soprattutto da legami non covalenti, infatti mediante auto-assemblaggio, le sonde di spin scelgono selettivamente l'ambiente che offre loro interazioni più forti. Queste possono essere usate per lo studio di molecole come i farmaci. Mentre l'utilizzo delle spin labels porta ad una maggiore modificazione del sistema con possibile alterazione della sua funzione. Negli ultimi tempi, sono state utilizzate per determinare la struttura di proteine e altre macromolecole.

In particolar modo, in questa sperimentazione sono state utilizzate tre spin probes diverse:

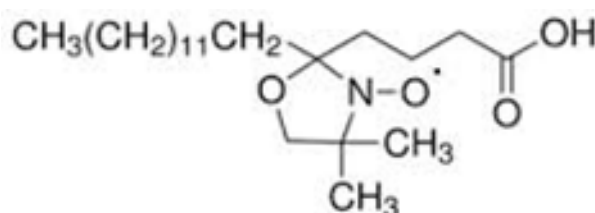
- 5DSA
- CAT8 e CAT16

Queste sonde presentano caratteristiche simili ai fosfolipidi e sono state scelte per le loro similarità con alcune porzioni dei quattro farmaci utilizzati.

Proprio per tale necessità, fra le sonde radicaliche di tipo nitrossido, comunemente impiegate per investigare i sistemi biologici, nel presente studio è stato scelto l'acido doxil stearico, 5DSA, una sonda paramagnetica, contenente un elettrone spaiato, dunque una sonda di tipo radicalico, dalle caratteristiche peculiari: è infatti di tipo apolare, dunque insolubile in acqua, e pertanto è stato inserito nel sistema oggetto di studio disciolto in una infinitesima aliquota di cloroformio tale da non perturbare né tantomeno indurre morte cellulare (0,5% in volume), sia in presenza che in assenza di cellule.

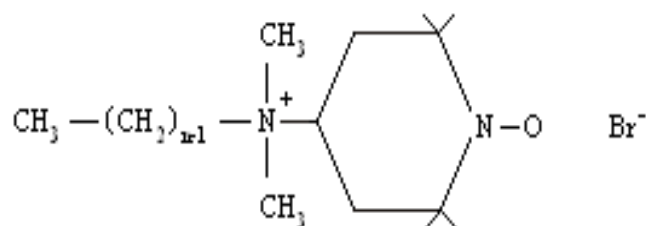
Questa sonda è particolarmente adatta a seguire variazioni di solubilità dei farmaci a seguito di interazioni fra le componenti che intervengono nei sistemi in esame (sonda-farmaci-cellule-terreno), in quanto, essendo apolare ed a carattere idrofobico, si posiziona internamente alla membrana cellulare permettendo di seguire il comportamento dei singoli farmaci.

Nella figura sottostante possiamo osservare la struttura chimica della sonda 5DSA:



**Figura 28:** struttura chimica della sonda acido doxil stearico 5DSA

Le sonde di tipo CAT(n) sono costituite da una stessa struttura di base dov'è presente il gruppo nitrossido e da una catena idrocarburica che varia in base al numero n (CAT 8 n=8 e CAT 16 n=16) di atomi di carbonio. Tra le altre differenze CAT8 è solubile in acqua ed è costituita da una porzione idrofilica carica positivamente (gruppo CAT) e una parte idrofobica (la catena di carbonio), mentre CAT 16 presenta una natura più antipatica a causa della catena idrocarburica più lunga.



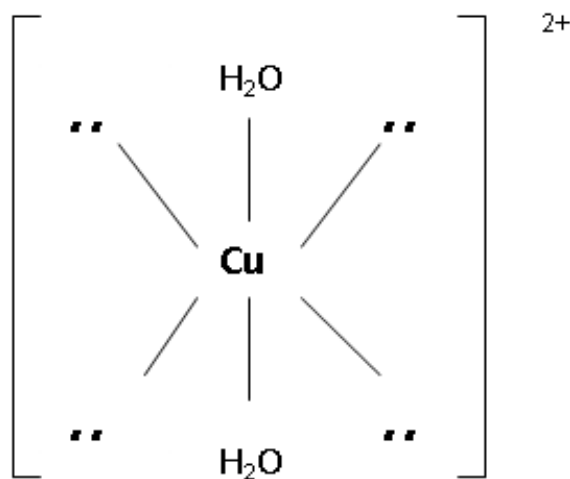
**Figura 29:** Struttura di base delle sonde CAT8 e CAT16



## 5.2 Ioni di metalli di transizione ( $\text{Cu}^{2+}$ )

Gli ioni di metalli di transizione vengono ampiamente utilizzati nella tecnica EPR come sonde paramagnetiche per le elevate informazioni che si possono trarre sulle proprietà superficiali o dei gruppi chimici che sono oggetto di studio; infatti questi elementi hanno gusci elettronici  $d$  e  $f$  parzialmente riempiti risultando spesso paramagnetici e quindi facilmente studiabili con la spettroscopia EPR.

Questi ioni generalmente sono complessati (legati) a ioni negativi, a molecole neutre o a entità poliatomiche.



*Figura 30: Complesso di coordinazione del rame*

La loro importanza è basata su:

- disponibilità di un elevato numero di elettroni spaiati ( spin totale  $S = 0 \rightarrow 5/2$ )
- disponibilità di specie con simmetrie locali semplici (cubiche) e strutturate vicino allo ione centrale
- varietà di possibili stati di ossidazione
- capacità di applicare adeguate teorie elettroniche come ad esempio il modello campo-cristallino.

Per quanto riguarda lo ione  $\text{Cu}^{2+}$  questo ha configurazione elettronica  $[\text{Ar}]3d^9$  (termine spettroscopico  $^2D$ ). Avendo un solo elettrone spaiato non presenta problemi di alto o basso spin. Per quanto riguarda la coordinazione con leganti ha, in genere, bassa simmetria e i suoi complessi, sia ottaedrici che tetraedrici, sono spesso distorti. Infatti in entrambi i casi si ha l'effetto Jahn-Teller<sup>167</sup>. Si ha poi un doppietto di Kramer (che è dovuto all'interazione spin-orbita) che viene risolto dall'applicazione del campo magnetico. I nuclidi più abbondanti in natura per il rame, sono il  $^{63}\text{Cu}$  (30%) e il  $^{65}\text{Cu}$  (70%) entrambi aventi spin nucleare  $I=3/2$ . Considerando che la differenza tra i due momenti magnetici nucleari è piccola possono venire trattati come lo stesso nucleo.

### *Teoria EPR applicata a ioni di metalli di transizione*

In questo lavoro sono stati utilizzati gli ioni metallici  $\text{Cu}^{2+}$  sia a temperatura ambiente che a 150K.

Nei paragrafi precedenti si è parlato della “condizione di risonanza”, condizione necessaria affinché avvenga assorbimento della radiazione. Una trattazione quantomeccanica del fenomeno della risonanza magnetica richiede l'utilizzo dell'operatore Hamiltoniano.

Per un complesso di un metallo di transizione sottoposto all'azione di un campo magnetico statico, l'Hamiltoniano generale può essere scritto come:

$$\hat{\chi} = \hat{\chi}_E + \hat{\chi}_V + \hat{\chi}_{LS} + \hat{\chi}_{SI} + \hat{\chi}_{ZFS} + \hat{\chi}_Q + \hat{\chi}_{HS} + \hat{\chi}_{HI}$$

dove si andranno ad analizzare qui di seguito i singoli contributi.

1)  $\hat{\chi}_E$  rappresenta l'Hamiltoniano elettronico che esprime l'energia cinetica totale degli elettroni, l'energia potenziale totale di interazione nucleo-elettroni e di interazione elettrone-elettrone (questo termine non interessa il momento magnetico e quindi non verrà trattato).

2)  $\hat{\chi}_V$  descrive l'effetto del campo cristallino (*crystal-field*); il contributo allo splitting energetico in questo caso varia notevolmente

in relazione dello ione, della natura dei leganti e della struttura del complesso (questo termine non verrà trattato perché non ha importanza per il momento magnetico).

3)  $\hat{\chi}_{LS} = \hat{\chi}_{SO}$  rappresenta l'interazione spin-orbita, cioè descrive l'accoppiamento tra il momento angolare orbitale e il momento di spin elettronico e produce un ulteriore splitting energetico dell'ordine di  $10^2$ - $10^3 \text{ cm}^{-1}$ .

4)  $\hat{\chi}_{SI} = \hat{\chi}_{\text{iperf}}$  rappresenta l'interazione iperfine e esprime l'interazione tra spin nucleare e spin elettronico, quindi è presente nei sistemi aventi spin nucleare non nullo.

5)  $\hat{\chi}_{ZFS}$  descrive l'interazione spin-spin ed è detto Hamiltoniano di *zero-fieldsplitting*; è presente nei sistemi contenenti più di un elettrone spaiato ( $S > 1/2$ ) e implica la rimozione della degenerazione in assenza di campo applicato.

6)  $\hat{\chi}_Q$  descrive l'interazione quadrupolare dello spin nucleare; questo contributo è presente solo nei sistemi con  $I > 1/2$ , ed è responsabile di una variazione di posizione delle righe. (nei sistemi da noi utilizzati risulta trascurabile).

7)  $\hat{\chi}_{HS}$  è l'Hamiltoniano descrive l'interazione Zeeman tra il campo magnetico statico ed il momento magnetico di spin elettronico.

8)  $\hat{\chi}_{HI}$  è il termine Zeeman nucleare; descrive l'interazione tra il campo magnetico statico ed il momento magnetico nucleare (anche questo termine risulta trascurabile).

L'Hamiltoniano che ci permette di valutare con buona approssimazione la posizione delle righe spettrali è quindi:

$$\hat{\chi} = \hat{\chi}_{LS} + \hat{\chi}_{HS} + \hat{\chi}_{SI} + \hat{\chi}_{ZFS}$$

Andiamo a vedere questi termini più in dettaglio.

Il termine  $\hat{\chi}_{LS}$  determina il valore del momento magnetico totale elettronico  $\underline{\hat{\mu}}$ , che è pari a:

$$\underline{\hat{\mu}} = \beta_e \cdot \underline{g} \cdot \underline{\hat{S}}$$

dove  $\beta_e$  è il magnetone di Bohr per l'elettrone e  $\underline{g}$  è un tensore che tiene conto del fatto che il momento magnetico associato all'elettrone è quello risultante dal momento angolare di spin elettronico ( $\underline{S}$ ) e dal momento angolare orbitale ( $\underline{L}$ ). Se il sistema è *isotropo*, cioè le cui proprietà sono indipendenti dall'orientazione nel campo magnetico applicato,  $\underline{g}$  è uno scalare indicato con  $g_s$ ; mentre se il sistema è *anisotropo*, dove le stesse proprietà sono fortemente dipendenti dall'orientazione assunta dalla molecola,  $\underline{g}$  è un tensore esprimibile tramite una matrice  $3 \times 3$ . Il sistema di riferimento per cui la matrice è diagonale è detto sistema di assi principale.

Nel caso di simmetria assiale i termini  $g_{xx}$  e  $g_{yy}$  del tensore  $g$  nel sistema di assi principale, sono uguali. Si introducono allora i simboli  $g_{\parallel} = g_{zz}$  e  $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$  quindi un sistema assiale avrà un tensore del tipo:

$$\begin{bmatrix} g_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & g_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & g_{\parallel} \end{bmatrix}$$

### 5.2.1 Interazione Zeeman

Il termine  $\hat{\chi}_{HS}$  descrive l'*interazione Zeeman* tra il campo magnetico statico ed il momento magnetico elettronico ed ha la seguente formula:

$$\hat{\chi}_{HS} = \beta_e \cdot \underline{B} \cdot \underline{g} \cdot \underline{\hat{S}}$$

dove  $\underline{B}$  rappresenta il campo magnetico statico.

Se come sistema di riferimento si sceglie il sistema di assi principale di  $\underline{g}$  e se si tratta un monocristallo, allora è possibile orientare opportunamente il campo magnetico  $\underline{B}$  in modo da misurare direttamente le componenti  $g^\perp$  e  $g^\parallel$ :

$$\underline{B} = (B_x, 0, 0) \rightarrow \hat{\chi}_{HS} = \beta_e \cdot B_x \cdot g^\perp \cdot \hat{S}_x$$

$$\underline{B} = (0, 0, B_z) \rightarrow \hat{\chi}_{HS} = \beta_e \cdot B_z \cdot g^\parallel \cdot \hat{S}_z$$

### 5.2.2 Interazione Iperfine

Il termine  $\hat{\chi}_{SI}$  indica l'interazione magnetica tra il momento magnetico di spin elettronico ed il momento magnetico di spin nucleare.

In genere:

$$\hat{\chi}_{SI} = \hat{I} \cdot \underline{\underline{A}} \cdot \hat{S}$$

dove:

$\hat{S} \rightarrow$  operatore momento angolare di spin elettronico

$\hat{I} \rightarrow$  operatore momento angolare di spin nucleare

$\underline{\underline{A}} \rightarrow$  tensore di interazione iperfine fra lo spin elettronico e lo spin nucleare

Per quanto riguarda il tensore  $\underline{\underline{A}}$ , questo è dato da:

$$\underline{\underline{A}} = a + \underline{\underline{T}}$$

dove  $a$  è uno scalare e prende il nome di *costante di accoppiamento iperfine isotropa* per la quale Fermi ha ricavato la seguente espressione:

$$a = 8/3 \pi g_e \beta_e g_N \beta_N / |\Psi(0)|^2$$

in cui  $|\Psi(0)|^2$  rappresenta la probabilità di trovare l'elettrone spaiato sul nucleo. Anche per il tensore  $\underline{\underline{A}}$  si può determinare un sistema di assi principali in cui il tensore è diagonale. Nel caso di simmetria assiale si ha;

$$\hat{\chi}_{SI} = T_{\parallel} \cdot \hat{S}_z \cdot I_z + T_{\perp} (\hat{S}_x \cdot \hat{I}_x + \hat{S}_y \cdot \hat{I}_y)$$

dove :  $T_{\parallel} = T_{zz}$  e  $T_{\perp} = T_{xx} = T_{yy}$

In questo calcolo non si è presa in considerazione l'interazione isotropia di Fermi, cioè della possibilità che l'elettrone sia sul nucleo, che rimane l'unico contributo di interazione iperfine quando i moti molecolari mediano a zero le anisotropie. In questo caso l'Hamiltoniano sarà:

$$\hat{\chi}_{SI} = a \cdot \hat{i} \cdot \hat{S}$$

### 5.2.3 Interazione spin-spin

Il termine  $\hat{\chi}_{ZFS}$  (Hamiltoniano di zero-field splitting) vale solo per lo ione  $Mn^{2+}$  dove  $S = 5/2$  e si manifesta quando gli spin elettronici si trovano a distanza ravvicinata. Se sono bloccati su siti vicini l'interazione è di tipo dipolo-dipolo. In questo caso l'interazione spin-spin provoca un aumento della larghezza di riga che dipende dalla distanza fra gli spin.

Nel caso di un sistema con g isotropo ( $g_s$ ) l'Hamiltoniano sarà dato da:

$$\hat{\chi}_{ZFS} = g_s^2 \cdot \beta_e^2 \cdot \left[ \frac{\hat{S}_1 \hat{S}_2}{r^3} - \frac{3(\hat{S}_1 \underline{r})(\hat{S}_2 \underline{r})}{r^5} \right]$$

dove si è considerato l'interazione dipolare tra due elettroni aventi operatori di spin  $S_1$  e  $S_2$  a distanza  $r$ . Questa condizione può essere estesa anche a casi dove l'interazione coinvolge più di due elettroni; in questo caso l'Hamiltoniano può essere ricondotto nella forma più generale:

$$\hat{\chi}_{ZFS} = \hat{S} \underline{\underline{D}} \hat{S}$$

La matrice  $3 \times 3$  corrispondente a  $\underline{\underline{D}}$  può essere diagonalizzata ed è possibile giungere ad una forma più semplice tenendo conto del fatto che  $D$  ha traccia nulla<sup>168</sup>

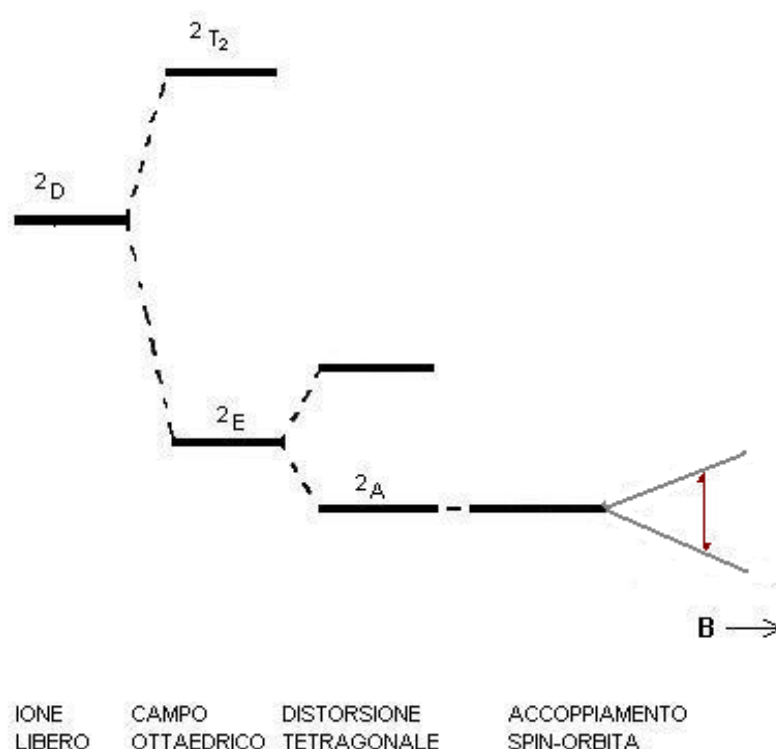
$$\hat{\chi}_{ZFS} = D \cdot \left( \hat{S}_z - \frac{\hat{S}^2}{3} \right) + E(\hat{S}_x^2 + \hat{S}_y^2)$$

$$\text{in cui } D = \frac{3}{2} D_{xx} \quad \text{e} \quad E = \frac{D_{xx} - D_{yy}}{2}$$

D viene detto parametro ZFS per la distorsione assiale ed E parametro ZFS per la distorsione perpendicolare; nel caso di simmetria assiale  $E = 0$  ( $D_{xx} = D_{yy}$ ).

#### 5.2.4 Spettri EPR di ioni $Cu^{2+}$

Il grafico dei livelli energetici elettronici per lo ione è riportato in figura 32, in cui è mostrato anche l'effetto della interazione Zeeman elettronica.



**Figura 31:** *Splitting degli stati di uno ione  $d^9$*

Cu è un nucleo con spin  $I=3/2$  e pertanto il suo spettro non è costituito da una sola riga bensì da quattro righe (n. righe =  $2I+1$ ). Tramite la teoria delle perturbazioni si possono calcolare i valori di campo magnetico per le quattro righe di assorbimento dello spettro EPR



$$B_z = \frac{h\nu_0 - \frac{m_I}{g_s} \cdot \sqrt{(A_{//}^2 \cdot g_{\perp}^2 - A_{\perp}^2 \cdot g_{//}^2) \cdot \cos^2 \gamma + A_{\perp}^2 \cdot g_{//}^2}}{\beta_e \cdot \sqrt{(g_{\perp}^2 - g_{//}^2) \cdot \cos^2 \gamma + g_{//}^2}}$$

dove:

$g_s = \sqrt{(g_{\perp}^2 - g_{//}^2) \cdot \cos^2 \gamma + g_{//}^2}$  e  $\gamma$  è l'angolo tra l'asse z del sistema di riferimento di laboratorio (cioè la direzione del campo magnetico) e l'asse z del sistema di assi principali di  $\underline{g}$  (è stato considerato che i sistemi di assi principali di  $\underline{A}$  e  $\underline{g}$  coincidono).

### 5.2.5 Il rilassamento e la larghezza di riga

Come si è detto l'assorbimento della radiazione microonde determina delle transizioni di spin. Il tempo di vita di uno stato di spin è legato all'interazione della molecola con il suo intorno, questo dà luogo a fenomeni di rilassamento che permettono al sistema di spin di cedere l'energia precedentemente assorbita al suo intorno e di tornare allo stato fondamentale. Se ciò non avvenisse o se la velocità delle transizioni fosse superiore a quella di rilassamento, si raggiungerebbe rapidamente una condizione di saturazione con conseguente perdita totale di assorbimento.

Principalmente i processi di rilassamento si devono ai campi magnetici fluttuanti locali generati dal moto molecolare. Se tali campi hanno frequenze di oscillazione simili a quelle del campo risonante possono determinare il rilassamento.

I processi di rilassamento hanno una notevole influenza sulla larghezza di riga. Se il tempo di vita di un sistema di spin si abbrevia in virtù del rilassamento, aumenta l'incertezza sul valore reale dell'energia con conseguente allargamento di riga, in accordo con quanto stabilito dal principio di indeterminazione ( $\Delta E \cdot \Delta t \geq \hbar/2$ ).

Esistono quindi due tipi di rilassamento :

longitudinale dovuto alle interazioni spin-reticolo, dove il sistema “caldo” cioè che ha guadagnato energia la cede all'intorno, detto

reticolo o in inglese *lattice*. Tutto ciò ha un *tempo di rilassamento longitudinale* o *spin-lattice* ( $T_1$ ).

trasversale dovuto all'interazione spin-spin caratterizzato da un *tempo di rilassamento trasversale* ( $T_2$ ) che corrisponde al tempo necessario affinché le direzioni degli spin si ridistribuiscono secondo tutti i possibili angoli attorno a z.

Il tempo più breve predomina. Quando l'interazione fra gli spin crea una serie di livelli energetici ravvicinati, ognuno dei quali presenta una energia indeterminata dal principio di Heisenberg, allora si ottiene una forma di riga gaussiana (involuppo di Lorentziane).

#### 5.2.6 Larghezza di riga per gli spettri dei complessi di $Cu^{2+}$

Il principale meccanismo di rilassamento per ioni  $Cu^{2+}$  è dato dalla modulazione nel tempo delle componenti dei tensori  $\underline{A}$  e  $\underline{g}$  dovuta alla diffusione riorientazionale (rotazionale) dello ione e dell'intorno a cui è legato (complesso).

Per sistemi in soluzione si può determinare il valore di  $T_2$ , giungendo così ad una valutazione della larghezza di riga in funzione delle componenti dei tensori  $\underline{A}$  e  $\underline{g}$ , del tempo di correlazione ( $\tau_c$ ) e dei valori di  $m_I$ .

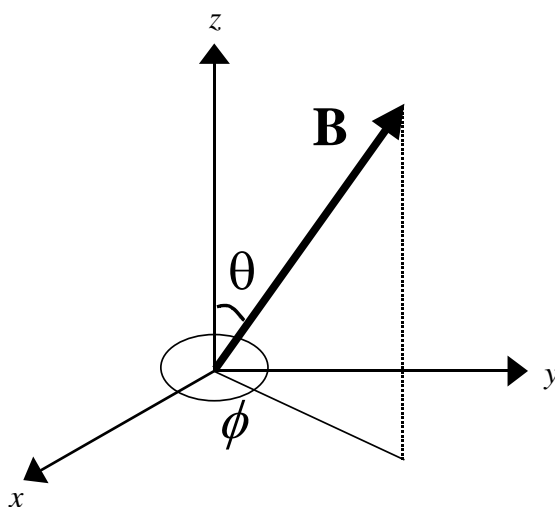
$$\frac{1}{T_2} = A + B \cdot m_I + C \cdot m_I^2 + \dots$$

dove A dipende dalla somma delle componenti dei tensori  $\underline{A}$  e  $\underline{g}$ , B dipende dal loro prodotto e C solo dalle componenti di  $\underline{A}$ . Tutte e tre le componenti dipendono inoltre dal valore di  $\tau_c$ .

A bassa temperatura si risolvono le anisotropie e possono essere quindi determinate le componenti anisotropiche dei tensori  $\underline{A}$  e  $\underline{g}$ . Nel nostro caso abbiamo effettuato spettri EPR del  $Cu(II)$  sia a temperatura ambiente che a 170 K. I parametri che si ricavano permettono di identificare natura e struttura dei complessi.

### 5.2.7 La forma di riga EPR per un insieme disordinato di molecole paramagnetiche

Consideriamo il caso di molecole paramagnetiche in stato di doppietto, dotate di una interazione iperfine con un nucleo con spin  $I$ . Come abbiamo visto, l'hamiltoniano di spin è dato dalla somma dell'interazione Zeeman tra il momento di spin e il campo magnetico, dell'interazione iperfine tra i momenti spin elettronico e nucleare e dell'interazione quadrupolare nel caso sia  $I > 1/2$ . A causa della anisotropia delle interazioni magnetiche, i valori dei livelli energetici dipendono dalla orientazione della molecola rispetto al campo magnetico Zeeman  $\mathbf{B}$ . Se fissiamo il sistema di riferimento sulla molecola, l'orientazione è definita dagli angoli  $\theta$  e  $\phi$  che  $\mathbf{B}$  forma con gli assi coordinati e pertanto in generale il valore del campo magnetico di risonanza della transizione  $m$ -ma è una funzione degli angoli  $\theta$  e  $\phi$ ,  $B_m(\theta, \phi)$



**Figura 32:** Orientazione del campo magnetico  $B$  rispetto un sistema di riferimento  $x, y, z$

## Forma di riga

$$\text{Lorentziana} \quad g(B-B_0) = \frac{w/\pi}{w^2 + (B-B_0)^2}$$

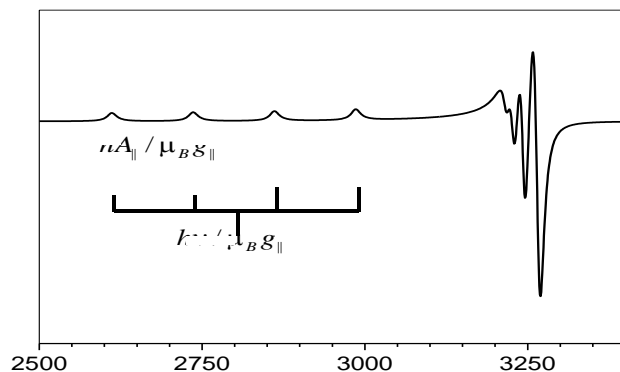
$$\text{Gaussiana} \quad g(B-B_0) = \sqrt{1/2\pi w^2} \exp[-(B-B_0)^2 / 2w^2]$$

Ad ogni orientazione lo spettro EPR è dato dalla somma di  $2I+1$  transizioni (se consideriamo solamente le transizioni permesse), e ciascuna di esse contribuisce con la derivata di una lorentziana o una gaussiana  $G[B-B_m(\theta, \phi)] = \partial g / \partial B$  alla forma dello spettro. La forma complessiva dello spettro di un insieme disordinato di molecole, come nel caso di una polvere policristallina o una soluzione gelata, può essere calcolato sommando su tutte le possibili orientazioni. Ogni orientazione dovrebbe essere pesata dalla probabilità di transizione, che però possiamo considerare indipendente dalla orientazione molecolare e quindi scriviamo:

$$I(B) = \sum_m \int G[B-B_m(\theta, \phi)] \sin \theta d\theta d\phi$$

L'integrazione è effettuata numericamente, scegliendo una griglia di punti sulla superficie della sfera unitaria. Il numero di punti necessari dipende dall'ampiezza dello spettro (che è funzione delle anisotropie delle interazioni magnetiche) e dalla larghezza  $w$  delle singole righe componenti: maggiore è il valore del rapporto tra ampiezza dello spettro e larghezza di riga e maggiore è il numero di punti di integrazione. L'integrazione è effettuata solamente sull'angolo  $\theta$  se il sistema molecolare ha simmetria assiale. Consideriamo a titolo di esempio un sistema di questo tipo, in cui lo spin dell'elettrone interagisce solamente con il campo magnetico e con lo spin di un nucleo con  $I=3/2$ . I valori dei campi di risonanza sono ricavati dall'espressione (1) sopra riportata (con  $\gamma = \theta$ )

In Figura è riportato uno spettro calcolato con i seguenti parametri:  
 $g_{\parallel} = 2.404$ ,  $g_{\perp} = 2.075$ ,  $\nu_0 = 9400 \text{ MHz}$ ,  $w = 10 \text{ Gauss}$ ,  $A_{\parallel} = 420 \text{ MHz}$ ,  $A_{\perp} = 42 \text{ MHz}$ .



**Figura 33:** Spettro dello ione  $\text{Cu(II)}$

Osserviamo che lo spettro è caratterizzato da quattro righe centrate a  $h\nu / \mu_B g_{\parallel}$  e separate da una distanza  $hA_{\parallel} / \mu_B g_{\parallel}$  e da quattro righe centrate a  $h\nu / \mu_B g_{\perp}$  e separate da una distanza  $hA_{\perp} / \mu_B g_{\perp}$ . Se la larghezza di riga è superiore al valore dello splitting iperfine, la separazione tra le righe non viene più risolta.

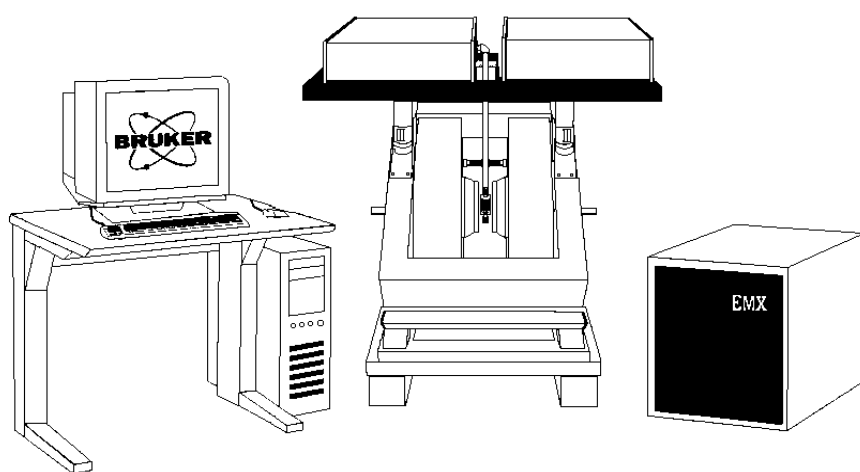
### 5.3 Strumentazione EPR

La tecnica EPR si serve di uno spettrometro in grado di misurare l'intensità della radiazione assorbita da parte dei dipoli magnetici del campione da analizzare.

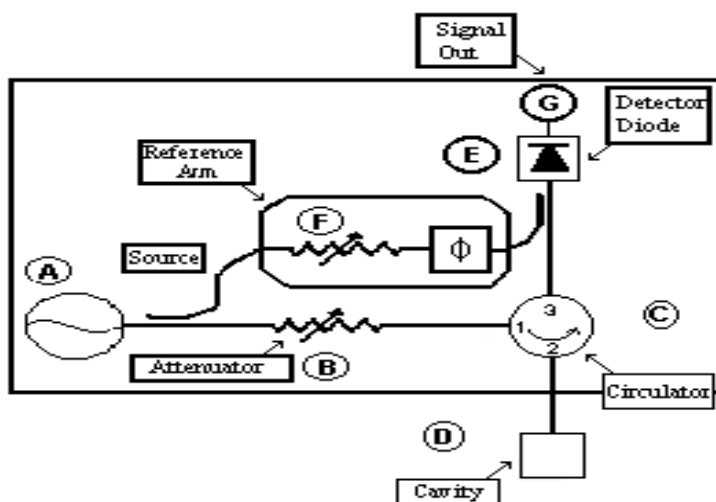
In questo lavoro lo strumento utilizzato è un modello Bruker EMX<sup>170</sup>, costituito fondamentalmente da:

- Unità magnete;
- Magnete;
- Ponte a microonde;
- Cavità EPR;
- Guida d'onda (collega il ponte alla cavità);

- Iris (vite che chiude e quindi dosa l'ingresso delle microonde alla cavità ed è azionata da un motorino e connettore di ottone).
- Generatore di campo magnetico;
- Consolle: gestisce lo strumento;
- Regolatore di temperatura;
- Computer con monitor e stampante per l'acquisizione dei dati;
- Linea per l'acqua di raffreddamento del magnete e del ponte



*Figura 34: Mostra l'impostazione generale di uno spettrometro EPR Bruker.*



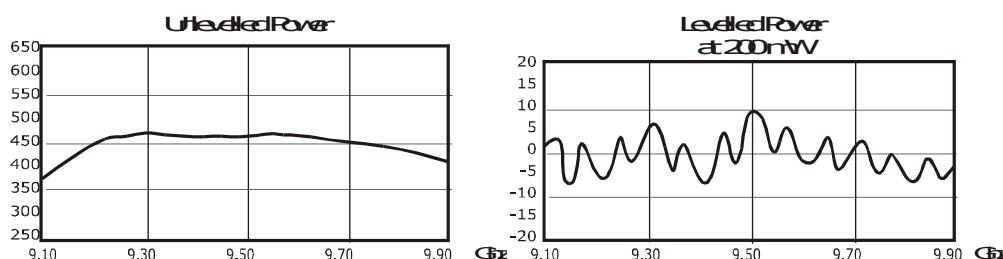
*Figura 35: Schema dello strumento.*

La figura 36 mostra uno schema a blocchi dello strumento<sup>169</sup> che aiuta a capirne il funzionamento nelle sue linee generali. La sorgente emette radiazioni elettromagnetiche nel campo delle microonde; queste sono convogliate nella cavità dove è presente il campione: la frazione assorbita rimane all'interno della cavità, producendo la transizione EPR, mentre la frazione non assorbita è riflessa indietro e è raccolta da un rivelatore che, attraverso un sistema elettronico ed informatico, fornisce lo spettro così come lo vediamo. Il segnale del rivelatore è funzione dell'intensità della radiazione assorbita. Il campo magnetico costante ( $B_0$ ) è generato da un elettromagnete posto ai due lati della cavità.

### 5.3.1 La sorgente

La sorgente ha la funzione di emettere radiazioni elettromagnetiche nel campo delle microonde ( $1\text{GHz} \leq \nu \leq 100\text{GHz}$ ), perché è in questa parte dello spettro che avvengono le transizioni EPR. In realtà, si utilizzano valori di  $\nu$  compresi fra 6.2 e 10.9 GHz, caratteristici della cosiddetta banda X. Nell'ampio spettro delle microonde, la sorgente non emette a tutte le lunghezze d'onda con la stessa intensità del segnale: vi sono delle zone in cui lo spettro di emissione risulta più intenso rispetto ad altre. Per fare in modo che l'intensità della radiazione incidente sia costante, un *livellatore* abbassa le intensità troppo elevate e le uniforma a quelle più basse, come mostrato in figura.

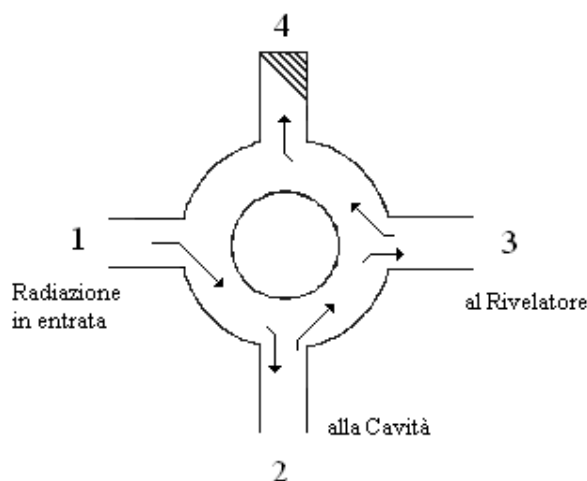
La radiazione elettromagnetica viene così condotta verso la cavità attraverso un sistema trasmissione delle microonde: le guide d'onda.



**Figura 36:** Intensità di emissione della sorgente. A sinistra il segnale non livellato, a destra l'emissione è costante, notare la diversa scala sulle ordinate

### 5.3.2 Il sistema di trasmissione delle microonde

Il cosiddetto *circolatore* è un dispositivo posto sopra la cavità, avente la funzione di indirizzare le onde elettromagnetiche, provenienti dalla sorgente, verso il campione e di incanalare quelle eventualmente riflesse, dal campione verso il sistema di rivelazione.



**Figura 37:** Schema del circolatore

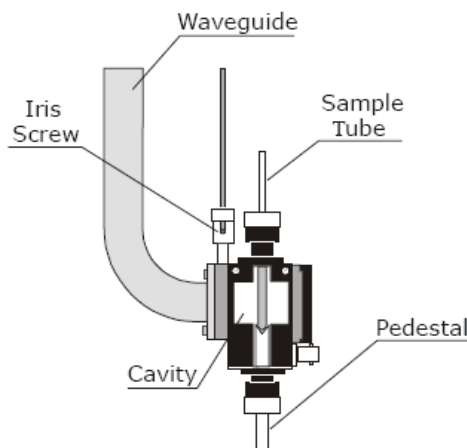
Il circolatore è composto da un sistema a quattro vie: una è rivolta verso la sorgente, una verso la cavità ed una verso il rivelatore. Una porta cieca (④) serve ad assorbire le eventuali radiazioni riflesse dal sistema di rivelazione e che tornano indietro dalla porta ③.

### 5.3.3 La cavità risonante

La cavità è il cuore dello strumento, poiché è la zona nella quale avviene l'assorbimento dell'energia elettromagnetica da parte del campione. L'attributo "risonante" è giustificato dal fatto che il segnale generato dal campione, a seguito dell'assorbimento, sarebbe estremamente debole se non venisse in qualche modo amplificato. Le microonde, aventi una  $\lambda$  nell'ordine dei centimetri, vengono fatte risuonare all'interno della cavità; questo fa in modo che le microonde assorbite dal campione vengano enormemente amplificate rispetto alle altre non assorbite, e per questo rimangono intrappolate al suo



interno. L'attributo “risonante” identifica anche la condizione di risonanza, cioè la condizione in cui la radiazione elettromagnetica viene assorbita dal sistema di spin.



**Figura 38:** Schema della cavità

La bontà di una cavità risonante può essere analiticamente espressa attraverso il *fattore di qualità*  $Q$ , che indica l'efficienza della cavità ad immagazzinare l'energia di microonde: all'aumentare di  $Q$  la sensibilità dello spettrometro aumenta.

$$Q = \frac{2\pi \times \text{energia immagazzinata}}{\text{energia dissipata per ciclo}}$$

dove *l'energia dissipata per ciclo*, è la quantità di energia persa durante un periodo di microonde. L'energia può essere persa dalla parete della cavità, perché le microonde, che generano corrente elettrica nella parete della cavità, generano poi calore. Il fattore  $Q$  può anche essere dato da:

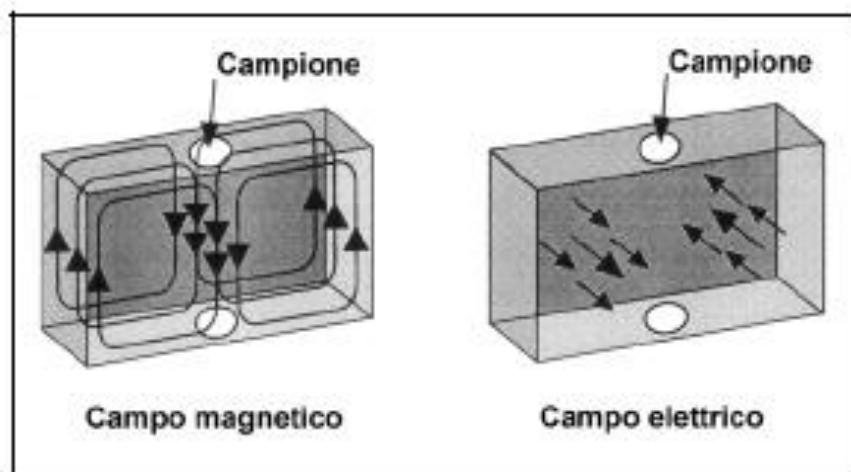
$$Q \text{ value} = \frac{\nu_{res}}{\Delta\nu}$$

dove  $\nu_{ris}$  è la frequenza di risonanza della cavità e  $\Delta\nu$  è l'ampiezza a metà altezza di risonanza.

Anche la geometria della cavità ha un ruolo importante nell'ottimizzazione delle sue prestazioni. Per le cavità più usate nelle

strumentazioni EPR; il campione viene posto al centro della figura, in posizione ideale.

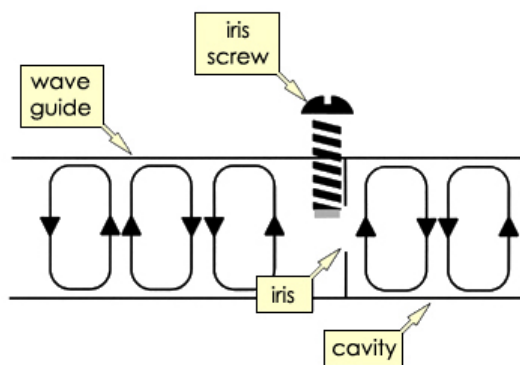
Se la cavità si comporta in maniera ottimale, si lavora al massimo della sensibilità, perché non si hanno dispersioni di energia, come la dispersione termica, e perché il campo magnetico  $B_1$ , responsabile della transizione da rivelare, è al massimo dell'intensità.



**Figura 39:** Linee di forza dei campi elettrico e magnetico presenti all'interno della cavità. Nel punto in cui si inserisce il campione, il campo magnetico è massimo, mentre quello elettrico è minimo.

#### 5.3.4 L'iris

La radiazione elettromagnetica viaggia attraverso le guide d'onda all'interno dello strumento, dalla sorgente al rivelatore; solo in un caso esse escono dalla guida d'onda: quando si trovano in cavità e vengono a contatto con il campione. Il raccordo fra questi due mezzi di propagazione delle microonde è svolto da un *IRIS* (o diaframma).



**Figura 40:** Schema del dosatore di radiazione microonde Iris Screw

Le microonde dentro la cavità sono accoppiate tramite questo foro di ingresso, il quale controlla quante microonde sono riflesse indietro dalla cavità e quante ne entrano. L'*IRIS* realizza tutto questo in modo molto accurato, accoppiando o trasformando l'impedenza (resistenza delle onde) della cavità e della guida d'onda. Una vite, detta anch'essa *iris*, di fronte all'*IRIS* di ingresso alla cavità, permette di aprire o chiudere in modo progressivo l'ingresso delle microonde e, quindi, permette di aggiustare l'accoppiamento, regolando l'impedenza della guida d'onda, in modo da uniformarla a quella della cavità (operazione di "*matching*"). Se non si intervenisse sull'*iris*, quando la radiazione a microonde passa da un mezzo ad un altro con diversa impedenza, una parte del fascio verrebbe riflesso indietro. Se il *matching* è eseguito in maniera corretta, l'energia trasmessa risulta massima e si ha un migliore rapporto segnale/rumore.

### 5.3.5 Il magnete

Il magnete, che in realtà è un elettromagnete, genera il campo statico  $\mathbf{B}_0$  che è responsabile della separazione dei livelli energetici di spin all'interno del campione. Esso deve essere costante in ogni punto della cavità. Per questo motivo, è necessario un controllo elettrico facilmente gestibile. Dato che il valore del campo magnetico è proporzionale alla corrente presente nelle spire dell'elettromagnete, variando la corrente ottengo il valore di  $B_0$  desiderato. Questo tipo di controllo è talmente efficiente e poco costoso che si preferisce variare

il campo magnetico  $B_0$ , piuttosto che la frequenza d'onda ( $\nu$ ) per ottenere gli spettri EPR.

### 5.3.6 Il rivelatore

Il rivelatore presente nello strumento EPR è un diodo sensibile alle microonde. Esso è generalmente costituito da un cristallo di silicio. Il rivelatore trasforma il segnale elettromagnetico proveniente dalla cavità in un segnale elettrico (corrente al diodo), portatore dell'informazione contenuta nelle microonde in uscita dalla cavità. A seconda dell'intensità della radiazione luminosa che colpisce il diodo, si ottiene un valore di corrente nel circuito del rivelatore. Il segnale elettrico così ottenuto è processato da un sistema informatico abbinato allo strumento.

### 5.3.7 Il braccio di riferimento

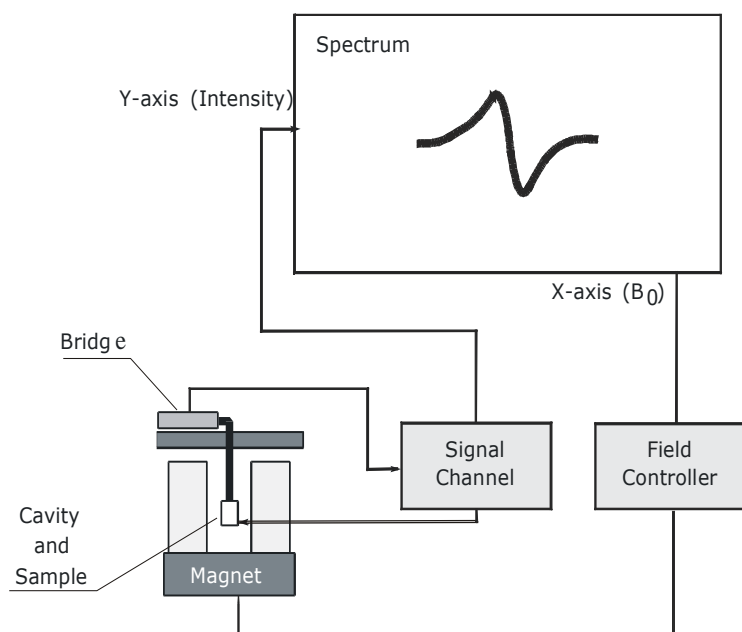
Il braccio di riferimento (o “*reference arm*”) è una linea di collegamento diretta fra la sorgente e il rivelatore: la radiazione emessa dalla sorgente by-passa la cavità. Per regolare la quantità di microonde (potenza) da far passare nel reference arm, piuttosto che in cavità c'è un *attenuatore variabile*, posto nelle linea principale. Il braccio di riferimento serve ad ottimizzare le prestazioni del rivelatore, aumentandone la sensibilità. Esso è costituito da due dispositivi:

il *bias*, (**o attenuatore variabile**) controlla la quantità di microonde che arrivano al diodo dal reference arm, in modo che la corrente circolante sia sempre maggiore di 200 $\mu$ A. Infatti la corrente al diodo è proporzionale alla differenza di potenziale presente nel circuito; quest'ultima è, poi, proporzionale alla potenza di microonde. A bassi livelli di potenza di microonde che raggiungono il diodo (<1mW), la proporzionalità fra  $i$  e  $V$  è quadratica (*rivelatore di secondo ordine*), mentre essa diventa lineare a valori maggiori di 1mW, corrispondente a 200 $\mu$ A (*rivelatore lineare*). Per operare sempre in questa regione, che è ottimale, il bias il *modificatore di fase*.

Il *signal phase* (**o modificatore di fase**) mantiene la sfasatura di  $\pi/2$  fra la componente di assorbimento e la componente di dispersione. Infatti la radiazione emessa dalla sorgente è formata da due componenti o fasi: la componente *reale*, corrispondente alla funzione seno è quella responsabile dell'assorbimento, mentre quella *immaginaria*, corrispondente alla funzione coseno, è detta componente di dispersione.

### 5.3.8 Lo spettro

Lo spettro EPR riporta l'andamento delle righe di assorbimento delle sostanze presenti in cavità. In ascissa compaiono i valori del campo magnetico costante  $B_0$ , perché è molto più semplice ed economico variare il campo magnetico attraverso un controller di corrente, piuttosto che selezionare in maniera precisa le radiazioni in uscita dalla sorgente. Allo strumento è collegato un calcolatore che trasforma il segnale elettrico del rivelatore in un dato di tipo informatico. Essa può essere, quindi, processata attraverso vari programmi che consentono di calcolare le aree dei picchi, le distanze e le altezze relative; questo permette che i dati abbiano un minore errore dovuto all'operatore.



**Figura 41:** In uscita dallo strumento si ottiene uno spettro che contiene tutte le informazioni relative al campione esaminato

# PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

---

### *Introduzione*

Nei prossimi paragrafi verranno descritte le fasi relative alla preparazione di tutti i campioni analizzati nelle tre diverse linee di ricerca:

*Prima linea di ricerca:* i dendrimeri, grazie alle loro caratteristiche intrinseche e alle proprietà inusuali che derivano dalla loro struttura, permettono processi di complessazione-coordinazione di ioni metallici, questo grazie alla capacità di incapsulare gli ioni; sono inoltre in grado di svolgere funzioni di carriers metallici, risultando ottimi traslocatori di farmaci; altri, a seguito di processi chimici, fungono da potenziali vettori anti-tumoral. Queste nuove strutture biologiche sono parte integrante di questo percorso di ricerca, durante il quale si è proceduto alla caratterizzazione chimico-fisica mediante sonde paramagnetiche, per poi validare la capacità di specifici glicodendrimeri di inibire la formazione di masse fibrillari tipiche di patologie neurodegenerative.

*Seconda linea di ricerca:* verranno descritte le fasi che hanno caratterizzato l'attività di ricerca improntata sul monitoraggio dell'evoluzione dei processi di complessazione a cui sono stati sottoposti particolari fosfodendrimeri a seguito dell'interazione con il nitrato di rame; stabilita la struttura e la stabilità dei polimeri, si è proceduto poi alla valutazione delle peculiari proprietà antitumorali dei complessi Cu-dendrimerine in confronti di cellule tumorali e non.

Questa linea nasce soprattutto a seguito del forte sviluppo dei nuovi nanomateriali e dei nanosistemi implicati nella nanomedicina, nella quale trovano largo impiego i dendrimeri, ma anche a seguito

dell'elevato potenziale antitumorale attribuito a complessi farmacologici contenenti Cu(II).

*Terza linea di ricerca:* l'obiettivo di questa sperimentazione è quello di studiare le caratteristiche chimico-fisiche di farmaci specifici, quali Imiquimod, 1V209, TMX-202, come agonisti, e TMX-302, come antagonista del recettore TLR7, fondamentale per l'attivazione della risposta immunitaria innata e adattiva. Lo studio eseguito mediante la Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR), ha fornito informazioni utili riguardo il comportamento delle varie molecole a livello dell'ambiente extra e intra-cellulare e all'interno del doppio strato fosfolipidico, a seguito dell'attraversamento della sonda, dovuto all'internalizzazione dei farmaci all'interno delle cellule. Per poter comprendere a pieno come o se il recettore TLR7 cambiasse il comportamento dei farmaci e delle sonde nel sistema, sono state impiegate due linee cellulari differenti.

*Prima linea di ricerca*

## **6.1 Materiali**

I materiali impiegati nella sperimentazione e nelle fasi di preparazione dei campioni al fine di monitorare il processo di aggregazione del peptide A $\beta$  1-40 sia in assenza che in presenza dei glicodendrimerie del rame, sono:

- Peptide A $\beta$ 1-40, peso molecolare 187,56
- Dendriemero PPI maltosio-SO<sub>3</sub> G5
- Sonda radicalica CAT8
- Buffer PBS, pH 7.4

### 6.1.1 Dendrimeri PPI-SO<sub>3</sub>G5

In questo studio sono stati utilizzati dendrimeri polipropileniminici funzionalizzati con maltosio e gruppi solfato (5-PPI-maltose-SO<sub>3</sub>), gli zuccheri vengono utilizzati poiché svolgono molti ruoli chiave nel riconoscimento molecolare su brevi distanze come ad esempio, le interazioni tra la matrice e le cellule vicine l'inclusione di zuccheri è un importante parametro di progettazione.

I dendrimeri in questione sono caratterizzati da un peso molecolare pari a 587000 e da ben 128 gruppi di superficie.

### 6.1.2 Sintesi dei dendrimeri polipropileniminici

I dendrimeri PPI sono sintetizzati a partire da un “core” butilendiamminico mediante una ripetitiva reazione sequenziale, l'addizione di Michael, che implica l'aggiunta di acrilonitrile ai gruppi amminici centrali seguita da una idrogenazione dei gruppi nitrilici ai gruppi amminici principali. I dendrimeri PPI sono commercialmente disponibili fino alla generazione G5, trovano applicazioni diffuse nella scienza e nella biologia. Attualmente, grandi quantità di dendrimeri puri PPI sono disponibili in commercio, distribuiti da Aldrich Chemical Co. e DSM. In questo studio sono stati utilizzati dendrimeri polipropileniminici funzionalizzati con maltosio e gruppi solfato (5-PPI-maltose-SO<sub>3</sub>), gli zuccheri vengono utilizzati poiché svolgono molti ruoli chiave nel riconoscimento molecolare su brevi distanze come ad esempio, le interazioni tra la matrice e le cellule vicine l'inclusione di zuccheri è un importante parametro di progettazione.

La sintesi dei PPI con gruppi maltosio modificati prevede:

#### ➤ *PPI di prima generazione con maltosio modificato.*

I dendrimeri PPI di I generazione (DAB-Am4) (0.15g, 0.474 mmol), maltosio (10.244 g, 28.4 mmol) e complessi di borano



piridina (2.84 mL, 28.4 mmol, soluzione 8M) sono stati aggiunti ad un tampone di borato di sodio (26mL, 0.1M). la soluzione reagente è stata agitata a 50°C per sette giorni; in seguito il prodotto è stato purificato mediante dialisi, per tre giorni. Il dendrimero è stato ottenuto mediante liofilizzazione.

➤ *PPI di seconda generazione con maltosio modificato.*

I dendrimeri PPI di II generazione (DAB-Am8) (0.2g, 0.258mmol), maltosio (14.74g, 40.91mmol) e complessi borano-piridina (4mL, 40mmol, soluzione 8M) sono stati aggiunti ad un tampone di borato di sodio (26mL, 0.1M). Il processo prevede tutti i passaggi effettuati nella sintesi della prima generazione, ovvero: agitazione, dialisi e processo di liofilizzazione per ottenere il dendrimero.

➤ *PPI di terza generazione con maltosio modificato.*

Sono state impiegate le stesse condizioni di reazione e le procedure utilizzate per la sintesi del dendrimero di seconda generazione. Queste sono state utilizzate per sintetizzare 0.2 g (1.186 mmol) del dendrimero di terza generazione e maltosio (14.74 g, 40.9 mmol).

➤ *PPI di quarta generazione con maltosio modificato.*

Processo identico a quello utilizzato per la sintesi del dendrimero di terza generazione, utilizzato per la sintesi di 1.26 g (91%) del dendrimero di quarta generazione.

➤ *PPI di quinta generazione con maltosio modificato.*

La sintesi di 0.2 g (91%) del dendrimero di quinta generazione prevede i medesimi step della sintesi dei dendrimeri di quarta generazione.

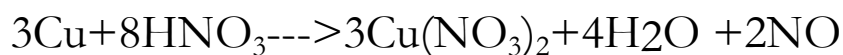
### 6.1.3 Sonda radicalica

L'impiego di sonde radicali che si rende necessario qualora il sistema che deve essere analizzato mediante EPR abbia elettroni perfettamente accoppiati.

Infatti, l'analisi spettroscopica viene effettuata solo su specie con almeno un elettrone spaiato, da qui la necessità di introdurre sonde paramagnetiche in sistemi che non presentino questa caratteristica. Abbiamo utilizzato come sonda il nitrato di rame  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , il suo peso molecolare è 187,56. Il nitrato rameico è il sale di rame (II) dell'acido nitrico.

A temperatura ambiente si presenta come un solido azzurro dall'odore di acido nitrico. È un composto nocivo, irritante; cristallizza come triidratao esaidrato.

Una piccola quantità di nitrato rameico può essere prodotta in laboratorio sotto cappa facendo reagire del rame metallico con acido nitrico concentrato. La reazione produce nitrato rameico, acqua e monossido di azoto ed è la seguente:



Oppure produce nitrato rameico, acqua e diossido di azoto ed è la seguente:



#### 6.1.4 Buffer PBS

Il buffer utilizzato è il PBS, un tampone fosfato salino, costituito da una soluzione tampone comunemente impiegata nella ricerca biologica. Si tratta di una soluzione salina acquosa contenente cloruro di sodio, fosfato di sodio e, in alcune formulazioni, cloruro di potassio. Il tampone aiuta a mantenere il pH costante, mentre la concentrazione di sali e l'osmolarità sono generalmente correlate con quelle del corpo umano (soluzione isotonica).

Ci sono diversi modi di preparare un tampone fosfato salino, ma generalmente i costituenti sono:

Sale	Concentrazione	Concentrazione
(—)	(mmol/L)	(g/L)
NaCl	137	8
KCl	2,7	0,20
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,1	1,44
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,17	0,24
pH	7,4	7,4

Il modo più semplice per preparare una soluzione PBS è utilizzare delle tavolette tampone PBS. Sono pastiglie preformulate per fornire una soluzione PBS standard in seguito a dissoluzione in una quantità

indicata di acqua distillata. Sono disponibili pastiglie per volumi standard di 100, 200, 500 e 1000 mL.

Nell'impiego in colture cellulari è spesso necessario sterilizzare in autoclave (20min a 121°C) le soluzioni PBS, che per prevenire la crescita batterica sono conservate in frigorifero. Le formulazioni più concentrate, tuttavia, possono dar luogo alla precipitazione dei sali che contengono in seguito a raffreddamento perdendo così le loro proprietà. In questi casi è necessario mantenere a temperatura ambiente.

Il PBS trova numerose applicazioni in ambito biologico grazie alla sua isotonicità e alla non tossicità sulle cellule. Viene utilizzato per diluizioni, per riportare a volume le colture cellulari.

Tutti i campioni sono stati preparati inizialmente in dei vials di piccole dimensioni, questo per ridurre al massimo la dispersione dei materiali che vengono aggiunti singolarmente con l'ausilio di una micropipetta. Una volta preparate le diverse soluzioni queste vengono inserite all'interno di pasteur di vetro opportunamente chiuse ad un'estremità.

L'analisi nella cavità risonante dell'EPR è stata eseguita sia a temperatura ambiente, 298 K che a bassa temperatura, 150 K.

### *6.1.5 Metodi*

La sperimentazione e l'acquisizione dei dati sono state effettuate mediante l'ausilio della tecnica EPR (cap 5), mentre come strumento di supporto per la preparazione dei campioni abbiamo utilizzato un piaccametro.

Un piaccametro o pH-metro è un apparecchio elettronico usato per misurare il pH di un liquido.

Può essere equipaggiato anche con sonde particolari adatte alla misura del pH di campioni solidi e semi-solidi. Un tipico piaccametro consiste di una sonda (un elettrodo a vetro) collegata ad un dispositivo elettronico che raccoglie il segnale della sonda, calcola il valore di pH corrispondente e lo rappresenta su un display.

La sonda per pH è generalmente un elettrodo a vetro che

misura la differenza di potenziale elettrico su due lati di una sottile membrana di vetro posta all'estremità dell'elettrodo, tale differenza di potenziale è legata alla differenza tra le concentrazioni degli ioni idrogeno all'interno e all'esterno della membrana. Un'unità di pH generalmente produce una differenza di potenziale di circa 0,059V.

Spesso le sonde immerse nella soluzione sono due: oltre all'elettrodo viene immersa anche una sonda di temperatura, il cui compito è correggere la lettura dell'elettrodo in funzione dell'effettiva temperatura del campione.

Il circuito del misuratore fondamentalmente è un voltmetro che mostra i risultati in scala di unità di pH anziché in volt. L'impedenza del misuratore deve essere molto alta, a causa dell'alta resistenza elettrica (tra i 20 e i 1000 M $\Omega$ ) degli elettrodi a vetro comunemente usati. Durante la preparazione dei campioni, il pH è stato regolato utilizzando piccole quantità di 10-100 mM NaOH o HCl ed è stato misurato utilizzando un pHmetro da banco con un elettrodo provvisto di uno stelo di diametro 3 millimetri e 55 millimetri in lunghezza in modo da consentire la lettura del pH dei campioni.

Il pH della maggior parte degli esperimenti era di 7.4 in modo da simulare il più possibile le condizioni fisiologiche.

#### *6.1.6 Classificazione dei campioni*

Il progetto di ricerca si sviluppa su tre diversi livelli, un primo approccio analitico prevede la caratterizzazione delle interazioni esistenti tra la sonda e il peptide e le modalità di queste, delle interazioni esistenti tra la sonda e il dendrimo, ed infine delle interazioni esistenti tra tutti i diversi componenti.

Sono stati preparati tre sistemi di riferimento:

1. un primo sistema binario dove verranno fatti interagire il Cu(II) ed il peptide A $\beta$  1-40;
2. un secondo sistema binario dove interagiranno il Cu(II) e il dendrimero G5 maltosio;

3. un terzo sistema, ternario, dove verranno fatti interagire il Cu(II), il peptide A $\beta$  1-40 e il dendrimero G5 maltosio.

*1. Sistema binario: Cu(II)+peptide A $\beta$  1-40*

- Cu(II) 0.1M + A $\beta$  0.02M
- Cu(II) 0.04M+ A $\beta$  0.02M
- Cu(II) 0.02M+ A $\beta$  0.02M
- Cu(II) 0.01M+ A $\beta$  0.02M
- Cu(II) 0.002M+ A $\beta$  0.02M

*2. Sistema binario: Cu(II)+PPIG5*

- 0.002MCu+0.1MPPIG5
- 0.005 MCu+0.1MPPIG5
- 0.02 MCu+0.1M PPIG5
- 0.04 MCu+0.1M PPIG5

*3. Sistema ternario: Cu(II)+peptide A $\beta$ + PPIG5*

- 0.02M Cu +0.02M A $\beta$  +0.02MPPIG5
- 0.02M Cu +0.02M A $\beta$ +0.05MPPIG5
- 0.02 M Cu + 0.02 M A $\beta$  + 0.1 M PPIG5

Allestito il piano di lavoro, si è proceduto con la preparazione delle diverse componenti.

Sono state inizialmente preparate delle stock solutions, soluzioni madre delle miscele necessarie, da cui prelevare di volta in volta il quantitativo necessario per ciascun campione.

### 6.1.7 Preparazione della sonda radicalica

Per il  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  abbiamo calcolato i diversi quantitativi in g da prelevare per scioglierli sia in acqua che in buffer. I quantitativi in g sono stati ottenuti applicando la formula:

$$M = \frac{\text{mol}}{V(\text{L})} = \frac{\text{g}}{\text{PM}} * \frac{1000}{V(\text{mL})}$$

1. La prima soluzione è 0.6 M

$$0.6 = \frac{\text{g}}{187.56} * \frac{1000}{0.1} = \frac{0.6 * 0.1 * 187.56}{10000} = 0.0112 \text{ g}$$

Si procede pesando 0.0112 g di  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  per poi scioglierli sia in 100  $\mu\text{L}$  di acqua che in 100  $\mu\text{L}$  di buffer.

2. La seconda soluzione è 0.4M, abbiamo applicato le stesse formule viste in precedenza e quindi per ottenerla abbiamo pesato 0.0375g di  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  e li abbiamo sciolti sia in 500  $\mu\text{L}$  di acqua che in 500  $\mu\text{L}$  di buffer.

3. La terza soluzione è 0.2 M, questa soluzione è stata ottenuta mediante una diluizione a partire dalla soluzione 0.4M. La formula che è stata applicata è:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \text{ da qui: } V_1 = (0.2 \cdot 500) / 0.4 = 250 \mu\text{L}$$

Sono stati prelevati 250  $\mu\text{L}$  dalla soluzione 0.4M, sia quella ottenuta in acqua che in buffer e per essere portati a volume finale di 500  $\mu\text{L}$  sia di acqua che di buffer.

4. La quarta soluzione è  $8 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ , questa soluzione è stata ottenuta pesando 0.0030 g di  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  che sono stati sciolti sia in 200  $\mu\text{L}$  di buffer che di acqua.

5. La quinta soluzione è  $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ , questa soluzione è stata ottenuta pesando 0.0094 g di  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  che sono stati sciolti sia in 1 mL di buffer che di acqua.

6. La sesta soluzione è  $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ , questa soluzione è stata ottenuta da una diluizione della soluzione 0.2M.

Abbiamo prelevato 100  $\mu\text{L}$  dalla soluzione 0.2M effettuata sia in acqua che in buffer e portato a volume con 900  $\mu\text{L}$  sia di acqua che di buffer

7. La settima soluzione è  $10^{-2} \text{ M}$ , questa soluzione è stata ottenuta da una diluizione della soluzione  $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ . Abbiamo prelevato 100  $\mu\text{L}$  dalla soluzione  $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  effettuata sia in acqua che in buffer e portato a volume con 100  $\mu\text{L}$  sia di acqua che di buffer.

8. L'ottava soluzione è  $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , questa soluzione è stata ottenuta da una diluizione della soluzione  $8 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ . Abbiamo prelevato 50  $\mu\text{L}$  dalla soluzione  $8 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  effettuata sia in acqua che in buffer e portato a volume con 950  $\mu\text{L}$  sia di acqua che di buffer.



### *6.1.8 Preparazione peptide*

Per il peptide A $\beta$  1-40, che ha peso molecolare di 4329.86, la concentrazione in campione è  $2 \cdot 10^{-2}$  M, quindi per ottenere questa soluzione abbiamo pesato 0.090g di A $\beta$  1-40 che abbiamo portato a volume con 107  $\mu$ L di buffer.

### *6.1.9 Preparazione dendrimeri*

Per la preparazione del dendrimero PPIG5 abbiamo calcolato i diversi quantitativi in grammi, in relazione alle concentrazioni che volevamo ottenere, da sciogliere poi in buffer.

1. La prima soluzione è 0.4 M, , questa soluzione è stata ottenuta pesando 0.3669 g di PPIG5 che sono stati sciolti in 2 mL di buffer.

2. La seconda soluzione è 0.2 M, , questa soluzione è stata ottenuta da una diluizione della soluzione 0.4M. Abbiamo prelevato 1mL dalla soluzione 0.4M in buffer e lo abbiamo portato a volume aggiungendo 1mL di buffer.

3. La terza soluzione è 0.1 M, , questa soluzione è stata ottenuta da una diluizione della soluzione 0.4M. Abbiamo prelevato 125  $\mu$ L dalla soluzione 0.4M in buffer e lo abbiamo portato a volume aggiungendo 375  $\mu$ L di buffer.

4. La quarta soluzione è  $4 \cdot 10^{-2}$  M, questa soluzione è stata ottenuta da una diluizione della soluzione 0.4 M. Abbiamo prelevato 50  $\mu$ L dalla soluzione 0.4M in buffer e lo abbiamo portato a volume aggiungendo 450  $\mu$ L di buffer.

5. La quinta soluzione è 0.2 M, questa soluzione è stata ottenuta pesando 0.0917 gr di PPIG5 che poi è stato sciolto in 1 mL di acqua.

6. La sesta soluzione è 0.1 M, questa soluzione è stata ottenuta da una diluizione della soluzione 0.2M, sono stati prelevati 100  $\mu\text{L}$  dalla soluzione 0.2 in acqua e portati a volume con 100  $\mu\text{L}$  di acqua.

7. La settima soluzione è  $4 \cdot 10^{-2}$  M, questa soluzione è stata ottenuta da una diluizione della soluzione 0.2M, sono stati prelevati 40  $\mu\text{L}$  dalla soluzione 0.2 in acqua e portati a volume con 160  $\mu\text{L}$  di acqua.

#### *6.1.10 Preparazione dei campioni*

*Sono stati allestiti i campioni del sistema primario:*  
Cu+PPIG5 in buffer

1.Cu 0.6 M+50 $\mu\text{L}$ diPPIG5 0.2M in buffer

2.Cu 0.2 M+ PPIG5 0.1M in buffer

3.Cu 0.1 M + PPIG5 0.1M in buffer

4.Cu  $8 \cdot 10^{-2}$  M + PPIG5 0.1Min buffer

5.Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M + PPIG5 0.1M in buffer+10 $\mu\text{L}$  di buffer

6.Cu  $2 \cdot 10^{-2}$  M + PPIG5 0.1M in buffer

7.Cu  $10^{-2}$  M + PPIG5 0.1M in buffer

8.Cu  $4 \cdot 10^{-3}$  M + PPIG50.2Min buffer

9.Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M+50 $\mu\text{L}$ diPPIG50.2Min buffer

**10.**  $\text{Cu} 5 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.4 \text{M in buffer} + 10 \mu\text{l di buffer}$

**11.**  $\text{Cu} 5 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.2 \text{M in buffer} + 10 \mu\text{l di buffer}$

**12.**  $\text{Cu} 5 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.1 \text{M in buffer} + 10 \mu\text{l di buffer}$

**13.**  $\text{Cu} 5 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 5 \cdot 4 \cdot 10^{-2} \text{M in buffer} + 10 \mu\text{l di buffer}$

*Si è proceduto poi con i campioni del sistema primario preparati in acqua:*

Cu+PPIG5 in acqua:

**14.**  $40 \mu\text{l di Cu} 5 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.4 \text{M in acqua} + 10 \mu\text{l di acqua}$

**15.**  $40 \mu\text{l di Cu} 5 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.2 \text{M in acqua} + 10 \mu\text{l di acqua}$

**16.**  $40 \mu\text{l di Cu} 5 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.1 \text{M in acqua} + 10 \mu\text{l di acqua}$

**17.**  $40 \mu\text{l di Cu} 5 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 5 \cdot 4 \cdot 10^{-2} \text{M in acqua} + 10 \mu\text{l di acqua}$

**18.**  $50 \mu\text{l di Cu } 0.6 \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.2 \text{M in acqua}$

**19.**  $50 \mu\text{l di Cu } 0.4 \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.2 \text{M in acqua}$

**20.**  $50 \mu\text{l di Cu } 0.2 \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.2 \text{M in acqua}$

**21.**  $50 \mu\text{l di Cu } 8 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.2 \text{M in acqua}$

**22.**  $50 \mu\text{l di Cu } 2 \cdot 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.2 \text{M in acqua}$

**23.**  $50 \mu\text{l di Cu } 10^{-2} \text{M} + 50 \mu\text{l di PPIG } 50.2 \text{M in acqua}$

**24.** 50  $\mu\text{l}$  di  $\text{Cu}4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  + 50  $\mu\text{l}$  di PPIG 50.2 M in acqua

*Si è proceduto poi con i campioni del sistema secondario preparati in buffer:*

Cu + A $\beta$  in buffer:

**25.** 50  $\mu\text{l}$  di Cu 0.2 M + 50  $\mu\text{l}$  di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer

**26.** 50  $\mu\text{l}$  di Cu  $8 \cdot 10^{-2}$  M + 50  $\mu\text{l}$  di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer

**27.** 40  $\mu\text{l}$  di Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M + 50  $\mu\text{l}$  di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer + 10  $\mu\text{l}$  di buffer

**28.** 50  $\mu\text{l}$  di Cu  $2 \cdot 10^{-2}$  M + 50  $\mu\text{l}$  di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer

**29.** 50  $\mu\text{l}$  di Cu  $4 \cdot 10^{-3}$  M + 50  $\mu\text{l}$  di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer

*Si è proceduto poi con i campioni del sistema secondario preparati in acqua*  
Cu + A $\beta$  in acqua:

**30.** 40  $\mu\text{l}$  di Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M + 50  $\mu\text{l}$  di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in acqua + 10  $\mu\text{l}$  di acqua

*Si è proceduto poi con i campioni del sistema ternario preparati in buffer:*  
Cu + A $\beta$  + PPIG 5 in buffer:

**31.** 40  $\mu\text{l}$  di Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M + 10  $\mu\text{l}$  di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer + 50  $\mu\text{l}$  di PPIG 5 0.4 M in buffer

**32.** 40  $\mu\text{l}$  di Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M + 10  $\mu\text{l}$  di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer + 50  $\mu\text{l}$  di PPIG 5 0.2 M in buffer

**33.** 40  $\mu$ l di Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M + 10  $\mu$ l di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer + 50  $\mu$ l di PPIG5 0.1 M in buffer

**34.** 40  $\mu$ l di Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M + 10  $\mu$ l di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer + 50  $\mu$ l di PPIG5  $4 \cdot 10^{-2}$  M in buffer

*Si è proceduto poi con i campioni del sistema ternario preparati in acqua:*

Cu + A $\beta$  + PPIG5 in acqua:

**35.** 40  $\mu$ l di Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M + 10  $\mu$ l di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in acqua + 50  $\mu$ l di PPIG5 0.2 M in acqua

#### *6.1.11 Preparazione bianchi*

Le soluzioni dei bianchi sono dei campioni di “controllo/riferimento” che ci permettono di effettuare confronti fra le diverse specie analizzate.

Sono stati preparate diverse tipologie di bianchi specifica per ogni singolo sostanza analizzata:

- Cu,
- A $\beta$ ,
- PPIG5,
- Cu + A $\beta$ .

*Preparazione:*

bianchi Cu in acqua e buffer

**1.** 50  $\mu$ l di Cu 0.6 M in buffer + 50  $\mu$ l di buffer

**2.** 50  $\mu$ l di Cu 0.4 M in buffer + 50  $\mu$ l di buffer

3.50  $\mu$ ldiCu 0.2 M inbuffer+50 $\mu$ ldibuffer

4.50  $\mu$ ldiCu  $8 \cdot 10^{-2}$  M in buffer+50 $\mu$ ldi buffer

5.40  $\mu$ ldiCu  $5 \cdot 10^{-2}$  M in buffer+60 $\mu$ ldi buffer

6.50  $\mu$ ldiCu  $2 \cdot 10^{-2}$  M inbuffer+50 $\mu$ ldi buffer

7.50  $\mu$ ldiCu  $10^{-2}$  M in buffer+50 $\mu$ ldibuffer

8.50  $\mu$ ldiCu  $4 \cdot 10^{-3}$  M in buffer+50 $\mu$ ldi buffer

9.40  $\mu$ ldiCu  $5 \cdot 10^{-2}$  M in acqua+60 $\mu$ ldiacqua

*Preparazione:*

bianchiA $\beta$  in buffer e acqua

1.50  $\mu$ ldiA $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  Min buffer+50  $\mu$ l di buffer

2.50  $\mu$ ldiA $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  Min acqua+50 $\mu$ ldiacqua

*Preparazione:*

bianchiPPIG5 in buffer e acqua

1.50  $\mu$ ldiPPIG5 0.2M in buffer+50  $\mu$ ldibuffer

2.50  $\mu$ ldiPPIG5 0.2M inacqua+50 $\mu$ ldiacqua

*Preparazione:*

bianchiCu eA $\beta$  in buffer e acqua

1.50  $\mu$ ldiCu  $5 \cdot 10^{-2}$  Minbuffer+50 $\mu$ ldiA $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  Min buffer

2.50  $\mu$ l di Cu  $5 \cdot 10^{-2}$  M in acqua + 50  $\mu$ l di A $\beta$   $4 \cdot 10^{-2}$  M in acqua

### *Seconda linea di ricerca*

In questa seconda parte verranno dettagliatamente descritte le fasi che hanno caratterizzato tutta l'attività di ricerca improntata sul monitoraggio dell'evoluzione dei processi di complessazione a cui sono stati sottoposti particolari fosfodendrimeri a seguito dell'interazione con il nitrato di rame; stabilita la struttura e la stabilità dei polimeri, si è proceduto poi nella valutazione delle peculiari proprietà antitumorali dei complessi Cu-dendrimeri nei confronti di cellule tumorali e non.

## **6.2 Materiali**

Il progetto di ricerca si sviluppa su due diversi livelli, un primo approccio analitico prevede l'impiego di:

- Fosfodendrimeri,
- Cu(II).

Mentre, una seconda fase analitica implica l'ausilio sempre dei fosfodendrimeri ma interagenti con:

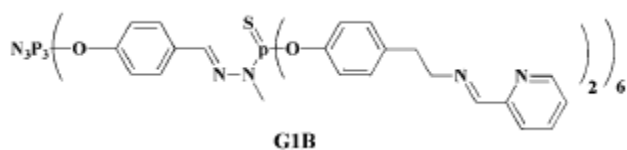
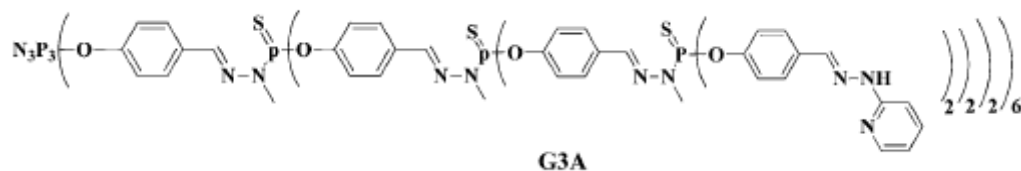
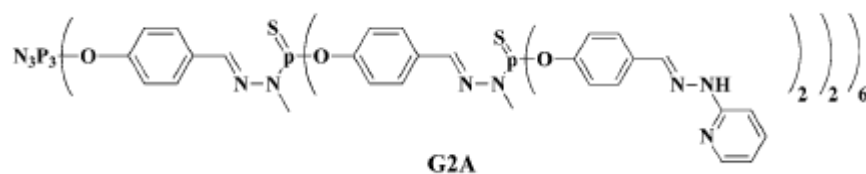
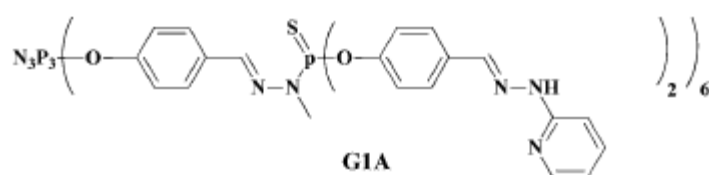
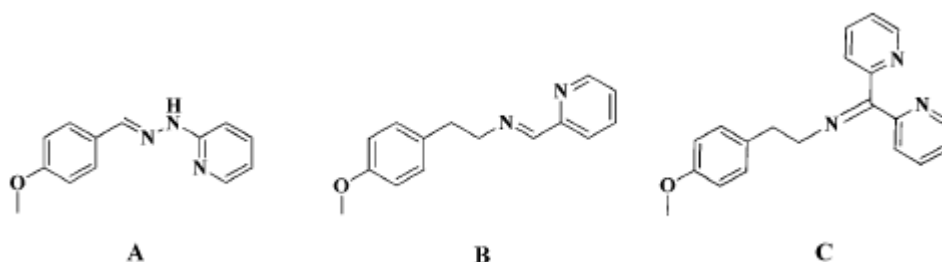
- linea cellulare MRC-5,
- linea cellulare HCT-116

### *6.2.1 Fosfodendrimeri*

Grazie alle loro caratteristiche intrinseche e alle proprietà inusuali che derivano dalla loro struttura, queste macromolecole permettono processi di complessazione/coordinazone di ioni metallici, permettendo di ottenere strutture stabili che siano poi in grado di traghettare tali complessi chemioterapici in prossimità delle cellule tumorali.

Le strutture dendrimeriche prese in esame, chiamate G1, G2 e G3, sono state differenziate sulla base del gruppo funzionale esterno con i monomeri denominati A, B e C.

Qui di seguito sono riportate le singole strutture chimiche dei monomeri e dei polimeri completi (figura 44):







**Figura 42:** strutture monomeri e dendrimeri

### 6.2.2 Sintesi dei fosfo-dendrimeri

La sintesi dei fosfodendrimeri avviene seguendo due step, il primo è una sostituzione nucleofila su P-CL funzionalizzata con 4-idrossibenzaldeide in condizioni basiche, il secondo è una reazione di condensazione fra le aldeidi e i gruppi amminici. La ripetizione di queste due reazioni viene impiegata per sintetizzare le diverse macromolecole.

Una delle proprietà più importanti è la loro stabilità termica, infatti vengono impiegati in processi di catalisi, dove la generazione G3 risulta essere il catalizzatore migliore.

Generalmente le strutture di entrambe le generazioni risultano pressoché simili a quelle delle proteine, pertanto si ritiene che possano interagire con i sistemi biologici<sup>29</sup>. Diversi studi mostrano la possibilità di utilizzarli nei processi di trasfezione, dendrimeri di G2 sono stati utilizzati nella trasfezione della luciferasi tramite plasmide nelle cellule eucariote<sup>30</sup>. Fosfodendrimeri di G3 e G5 vengono impiegati come agenti anti-prionici, risultando molto attivi dato che riducono sia

l'accumulo del PrPSC oltre l'80% sia riducendo l'infezione stessa. In questo caso l'azione risulta generazione-dipendente, dato che la G4 è quella più attiva<sup>31</sup>. E' ovvio che dimensioni, forma e funzionalità possono essere modificate secondo il fine ultimo di impiego, ma fondamentali sono le dimensioni sia negli esperimenti di catalisi che in quelli biologici.

Nella maggior parte degli studi in ambito delle scienze dei materiali, i fosfodendrimeri possono essere incorporati all'interno dei materiali durante la sintesi o vengono utilizzati successivamente per modificare le loro superfici<sup>32</sup>.

### *6.2.3 Preparazione campioni (caratterizzazione dendrimero/Cu)*

Per confrontare gli spettri delle serie A, B e C con quelli dei singoli dendrimeri analizzati, tutti sono stati acquisiti nelle stesse condizioni sperimentali, ovvero aggiungendo  $\text{Cu}^{2+}$  a concentrazione crescente. Inizialmente sono state preparate le stock solutions delle miscele dalle quali poi sono state prelevate le quantità opportune per ogni campione.

La soluzione iniziale per il dendrimero è di 0.2 M che risulterà pari allo 0.1 M una volta aggiunto alle diverse concentrazioni di sonda radicalica, sia i dendrimeri che i gruppi chelanti sono stati disciolti in soluzioni di DMF (N,N-dimetilformammide). Il nitrato di rame idrato ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \bullet 2.5\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich, reagente ACS 98%), in miscela con i dendrimeri e i monomeri A, B e C, è stato disciolto in DMF per ottenere concentrazioni finali dallo 0.0025 M fino allo 0.5 M. Alle varie soluzioni madri è stato aggiunto nitrato rameico a concentrazioni diverse di,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  al fine di ottenere delle soluzioni madre di sonda, dalle quali poi preparare le altre diluizioni, ricordando di calcolare tutte le concentrazioni doppie dato che la sonda subisce una diluizione.

I singoli campioni sono stati costituiti prelevando dai pozzetti 50 $\mu$ l dalle varie soluzioni Cu aggiunti ai 50  $\mu$ l dei dendrimeri, per essere poi inseriti nei vials e posti nella cavità EPR per l'analisi.

#### *6.2.4 Preparazione campioni (interazione dendrimero/ linee cellulari)*

Per quanto riguarda, invece, lo studio sulle interazioni tra il complesso Cu-dendrimeri e i sistemi biologici, sono state prese in considerazione due linee cellulari:

- le cellule tumorali HCT-116,
- le cellule normali MRC-5.

Le cellule fibroblastiche polmonari umane fetali, sono state coltivate in DMEM con il 10% di siero fetale bovino (FSC), diversamente la linea cellulare umana del carcinoma al colon, HCT-116, è stata coltivata nel terreno di coltura RPMI 1640 integrato con il 10% di FBS, a 37°C.

Previo esperimento, le cellule MRC-5 sono state risospese in Trispina, per favorire il distacco e la rottura di eventuali clusters, mantenute a 37°C con il 5%CO<sub>2</sub> per 3 minuti, poi centrifugate (1200rpm) per 10 minuti.

Analogamente le cellule tumorali sono state risospese in Tripsina, seminate e mantenute a 37°C con il 5%CO<sub>2</sub> per 3 minuti per essere poi successivamente centrifugate; la vitalità cellulare per entrambe le linee è stata valutata usando il test di esclusione del Trypan Blue.

Per la preparazione dei campioni le cellule sono state divise in 96 pozzetti (2000 cellule per 100 $\mu$ l) e incubate per 48h e 72h con l'idrato nitrato rameico e in assenza e in presenza di G3B.

Trascorsi i tempi di incubazione prestabiliti, i campioni cellule/dend-Cu), sono stati inseriti nella cavità EPR per l'analisi degli spettri.

### 6.2.5 Metodi

Le analisi sono state condotte mediante l'impiego della tecnica EPR (cap. 5); per la riuscita dell'esperimento è stato fondamentale monitorare le vitalità cellulare mediante saggio Tryplan Blue.

### 6.2.6 Colorazioni vitali

Le tecniche di colorazione sono un indispensabile supporto per la visualizzazione delle cellule e tessuti in microscopia. I coloranti sono frequentemente usati in biologia e medicina per evidenziare le strutture proprie del tessuto (es. fibre muscolari o tessuto connettivo), i tipi cellulari (es. granulociti, basofili, eosinofili) o le strutture all'interno delle cellule (es. nucleo, mitocondri). Un'importante distinzione va fatta tra colorazioni "vitali" e "non vitali". Le colorazioni vitali sono fatte su cellule vive e hanno come finalità quella di svelare particolari morfologici altrimenti non visibili oppure di indicare lo stato metabolico della cellula. Sono vitali quelle colorazioni che mirano a scoprire il rapporto tra cellule vive e morte. Le colorazioni non vitali sono eseguite su cellule morte dopo opportuna preparazione del campione, detta fissazione. Nelle colorazioni vitali le cellule devono essere modificate il meno possibile prima dell'osservazione e bisogna fare molta attenzione alla tossicità del colorante usato. Per questo motivo spesso i coloranti vitali sono usati come soluzioni molto diluite (1:5000 – 1:500000).

La colorazione vitale utilizzata per la conta cellulare è stata quella del Trypan blue (Blu benzamina, Blu naftilamina, Blu Niagara). Il colorante è stato sintetizzato agli inizi del novecento come derivato del toluene, e deve il suo nome alla proprietà di essere tossico per il parassita tripanosoma (analoghi del trypan blue sono attualmente usati come agenti farmacologici).

Il Trypan Blue viene comunemente usato nella colorazione vitale con un metodo definito come colorazione per esclusione. Infatti, le

membrane cellulari sono normalmente impermeabili a tale colorante, mentre le cellule morte, sia apoptotiche che necrotiche, si colorano di blu (senza possibilità di distinzione).

Per il conteggio delle cellule è stata preparata una soluzione costituita da 25 µl di sospensione cellulare alla quale sono stati aggiunti altri 25 µl di Trypan blue (diluizione 1:2). Successivamente sono stati prelevati 10 µl dalla sospensione appena ottenuta i quali sono poi stati iniettati all'interno di una camera di Burker per la conta cellulare. La camera di Burker permette il conteggio al microscopio delle cellule trattate attraverso la seguente formula:

Numero di cellule per ml = numero di cellule contate x 2 x 10<sup>4</sup>

Il numero di cellule contate è dato dal rapporto tra il numero totale di cellule contate con il numero di quadrati da 1mm<sup>2</sup> contati ed indica dunque il valore medio di cellule contate. Il numero "2" rappresenta il fattore di diluizione che dunque dipende dalla quantità di Trypan Blue utilizzato e permette di ottenere il numero di cellule per µl della sospensione originale. Il tutto viene moltiplicato per 10<sup>4</sup> che rappresenta un fattore che tiene conto del volume della camera. Se a questa formula si aggiunge come ulteriore fattore la quantità in ml della cultura iniziale, è possibile risalire al numero totale di cellule nella cultura da cui è stato prelevato il campione analizzato.

Le cellule vive sono quelle che dopo il saggio con il Trypan Blue non si colorano, mentre il numero totale di cellule rappresenta la somma delle cellule colorate con quelle non colorate e cioè di quelle morte e di quelle vive.

Dopodiché, è possibile calcolare la vitalità delle cellule trattate attraverso la seguente formula:

$$\% \text{ vitalità cellulare} = \frac{\text{numero di cellule vive}}{\text{totale di cellule}} \times 100$$

Le cellule vive sono quelle che dopo il saggio con il Trypan Blue non si colorano, mentre il numero totale di cellule rappresenta la somma delle cellule colorate con quelle non colorate e cioè di quelle morte e di quelle vive.

### *Terza linea di ricerca*

#### *Introduzione*

Di seguito verranno descritte le fasi di preparazione che hanno caratterizzato tutta l'attività di ricerca improntata sulla caratterizzazione di nuovi farmaci chemioterapici.

### **6.3 Materiali**

In questa fase sperimentale l'attenzione è rivolta all'interazione esistente tra farmaci antitumorali di nuova sintesi già esposti nel cap. 2, e due linee cellulari, le HEK BLUE e NULL, ampiamente illustrate al cap. 4. Ciò che ha permesso di monitorare le interazioni esistenti tra i due sistemi sono diverse tipologie di sonde largamente impiegate nelle analisi EPR.

#### *6.3.1 Sonda 5DSA*

La sonda 5DSA, deve avere una concentrazione finale di  $5 \times 10^{-4}$  M, in un volume di 200  $\mu$ L per entrambe le linee cellulari.

Dunque la concentrazione iniziale che deve essere presente in un volume di 1  $\mu$ L è così calcolata secondo le regole di proporzione:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

dove:

$C_1$  è la concentrazione iniziale da calcolare,

$C_2$ , la concentrazione finale che sarà uguale a  $5 \times 10^{-4}$  M,

$V_1$ , ovvero il volume iniziale, pari a 1  $\mu$ l,

$V_2$ , uguale a 200  $\mu$ l, ovvero il volume finale;

quindi avremo che:

$$C_1 = (C_2 \times V_2) / V_1 = (5 \times 10^{-4} \text{ M} \times 200 \mu\text{l}) / 1 \mu\text{l} = 1 \times 10^{-1} \text{ M}$$

5DSA ha un peso molecolare pari a 384,6 PM, quindi è stato possibile calcolare la quantità in grammi della sonda che deve essere utilizzata per ottenere una concentrazione iniziale di  $1 \times 10^{-1}$  M:

$$M = n^\circ \text{ moli} / V(\text{l}) = g \times 1000 \text{ ml} / \text{PM} \times V (\text{ml})$$

$$\Rightarrow g = (M \times \text{PM} \times V (\text{ml})) / 1000 \text{ ml} = (1 \times 10^{-1} \text{ M} \times 384,6 \times 2 \text{ ml}) / 1000 \text{ ml} = 0,07694 \text{ g}$$

La quantità in grammi di 5DSA appena ottenuta è stata aggiunta a 5 ml di DMEM. Quindi dalla soluzione di 0.1M sono stati prelevati 1  $\mu$ l che sono stati aggiunti ai pozzetti.

### 6.3.2 Sonda CAT 8

La concentrazione di sonda finale dovrà essere di  $5 \times 10^{-4}$  M e il volume dovrà essere pari a 200  $\mu$ l. E' possibile ricavare la concentrazione iniziale della sonda, sapendo che il volume iniziale aggiunto ai pozzetti è di 50  $\mu$ l, mediante la seguente proporzione:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

dove:

$C_1$  è la concentrazione iniziale da calcolare,

$C_2$ , la concentrazione finale che sarà uguale a  $5 \times 10^{-4}$  M,  
 $V_1$ , ovvero il volume iniziale, pari a 50  $\mu$ l,  
 $V_2$ , uguale a 200  $\mu$ l, ovvero il volume finale;

quindi avremo che:

$$C_1 = (C_2 \times V_2) / V_1 = (5 \times 10^{-4} \text{M} \times 200 \mu\text{l}) / 50 \mu\text{l} = 2 \times 10^{-3} \text{M}$$

Il CAT8 ha un peso molecolare pari a 392 PM, quindi è stato possibile calcolare la quantità in grammi della sonda che deve essere utilizzata per ottenere una concentrazione iniziale di  $2 \times 10^{-3}$  M:

$$M = n^\circ \text{ moli} / V(\text{l}) = g \times 1000 \text{ml} / \text{PM} \times V (\text{ml})$$

$$\Rightarrow g = (M \times \text{PM} \times V (\text{ml}) ) / 1000 \text{ ml} = (2 \times 10^{-3} \text{M} \times 392 \times 5 \text{ ml}) / 1000 \text{ ml} = 0,00392 \text{g}$$

La quantità in grammi di CAT8 appena ottenuta è stata aggiunta a 5 ml di DMEM. Quindi dalla soluzione di  $2 \times 10^{-3}$  M sono stati prelevati 50  $\mu$ l che sono stati aggiunti ai pozzetti.

### 6.3.3 Sonda CAT16

I calcoli per ottenere la concentrazione iniziale di CAT16, sono gli stessi che abbiamo utilizzato per il CAT8. La concentrazione finale dovrà essere, sempre pari a  $5 \times 10^{-4}$  M, e il volume pari a 200  $\mu$ l. Sapendo che il volume di CAT16 aggiunta ai vari pozzetti è di 50  $\mu$ l, la proporzione sarà:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Quindi:

$$C_1 = (C_2 \times V_2) / V_1 = (5 \times 10^{-4} \text{M} \times 200 \mu\text{l}) / 50 \mu\text{l} = 2 \times 10^{-3} \text{M}$$



Sapendo che il peso molecolare della sonda CAT16 è di 504 PM, il peso in grammi sarà:

$$M = n \text{ moli} / V \text{ (l)} = g \times 1000 \text{ ml} / \text{PM} \times V \text{ (ml)}$$

$$\Rightarrow g = (M \times \text{PM} \times V \text{ (ml)}) / 1000 \text{ ml} = (2 \times 10^{-3} \text{ M} \times 504 \times 5 \text{ ml}) / 1000 \text{ ml} = 0,00504 \text{ g}$$

La quantità di sonda CAT16 pari a 0,00504 g appena ottenuta è stata aggiunta a 5 ml di DMEM. Quindi dalla soluzione di  $2 \times 10^{-3} \text{ M}$  sono stati prelevati 50  $\mu\text{l}$  che sono stati aggiunti ai pozzetti.

#### *6.3.4 Preparazione farmaci*

Per quanto concerne la preparazione dei farmaci per l'analisi EPR, attraverso una serie di diluizioni sono state ottenute delle soluzioni finali con concentrazione pari a  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , per ciascun farmaco.

Per avere una soluzione finale con tale concentrazione, si parte da delle soluzioni madre specifiche per ogni farmaco, da cui si ricavano delle soluzioni intermedie con una concentrazione pari a  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

Attraverso ulteriore diluizione delle soluzioni intermedie si ottengono le soluzioni finali con la concentrazione desiderata.

##### *6.3.4.1 Preparazione farmaci intermedi*

Sulla base delle formule sopra riportate, con campione di farmaco in polvere, nel mio caso dell'Imiquimod, pari ad un peso di 1,006 g e un peso molecolare di 240,3 PM, abbiamo ricavato una soluzione madre pari a 0,8 M. Prima di tutto abbiamo calcolato il volume di DMEM da aggiungere all'Imiquimod con le seguenti formule:

$$V \text{ (ml)} = (1,006 \text{ g} \times 1000 \text{ ml}) / (240,3 \text{ M} \times 0,8 \text{ M}) = 5,23 \text{ ml}$$

In seguito mediante opportune diluizioni della soluzione madre ottenuta, si è ricavato il volume della soluzione intermedia  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ :

$$V \text{ (ml)} = (1 \times 10^{-3} \text{ M} \times 10 \text{ ml}) / 0,8 \text{ M} = 0,0125 \text{ ml}$$

A questo punto, sono stati prelevati 0,0125 ml dalla soluzione 0,8 M e per poter ottenere un volume finale di 10 ml abbiamo aggiunto 9,9815 del campione.

Riguardo gli altri farmaci i calcoli sono gli stessi, basta cambiare i parametri da immettere nell'equazioni, quindi:

- **1V209** dovrà avere una soluzione madre pari a 0,2 M, inoltre, sapendo che questo farmacoforo ha un peso di 1,00 g e un peso molecolare di 789,83 PM, il volume del DMEM che dovrà essere aggiunto sarà  $M=6,33 \text{ ml}$ , da tale soluzione è stata eseguita una diluizione per ottenere la soluzione intermedia con concentrazione di  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ . Quindi il volume da prelevare dalla soluzione madre, calcolato con una proporzione uguale a quella per l'Imiquimod, è pari a  $V_1=0,05 \text{ ml} = 50 \text{ }\mu\text{l}$ . Sono stati prelevati, così, 50  $\mu\text{l}$  dalla soluzione madre 0,2 M e a questi sono stati aggiunti 9,95 ml di DMEM per ottenere la soluzione intermedia di  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ .
- **TMX-202** ha un peso di 1,0023 g e un PM=921, per ottenere una soluzione madre di 1M, il volume di DMEM, che è stato aggiunto, è di 1,088 ml. Dalla soluzione madre appena ottenuta, è stato possibile ricavare una soluzione intermedia con concentrazione pari a  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , che corrisponde ad un volume di 10  $\mu\text{l}$ , che è stato prelevato e a cui sono stati aggiunti 9,99 ml di DMEM.
- **TMX-302**, come il TMX-202, dovrà avere una soluzione madre di 1 M. TMX-302 ha un peso molecolare di 791 e un peso di 1,0063 g, quindi il volume di DMEM che dovrà essere aggiunto per ricavare la soluzione madre sarà di 1,272 ml. In seguito, per avere la soluzione intermedia con concentrazione pari a  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , è stata eseguita una diluizione, il cui volume risultante è stato di 10  $\mu\text{l}$ , che è stato così prelevato dalla soluzione madre, a cui sono stati aggiunti 9,99 ml di

DMEM.

### *6.3.5 Preparazione finale della soluzione dei farmaci*

La soluzione finale dell'Imiquimod da ottenere, per effettuare le analisi all'EPR, deve avere un volume di 200  $\mu$ l con concentrazione pari a  $1 \times 10^{-5}$  M.

Se in ogni pozzetto deve essere aggiunto un volume di 50  $\mu$ l di farmaco, abbiamo dovuto ottenere una soluzione di partenza più concentrata mediante la seguente proporzione:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

dove:

- $C_1$ , concentrazione iniziale da calcolare,
- $C_2$ , concentrazione finale, uguale a  $1 \times 10^{-5}$  M
- $V_1$ , volume iniziale, pari a 50  $\mu$ l
- $V_2$ , volume finale di 200  $\mu$ l

quindi:

$$C_1 = (C_2 \times V_2) / V_1 = (1 \times 10^{-5} \text{ M} \times 200 \mu\text{l}) / 50 \mu\text{l} = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Per arrivare ad volume pari a 5 ml, abbiamo calcolato come segue il volume corrispondente alla soluzione  $1 \times 10^{-3}$  M:

$$V = (4 \times 10^{-5} \text{ M} \times 5 \text{ ml}) / 1 \times 10^{-3} \text{ M} = 0,2 \text{ ml}$$

Quindi abbiamo prelevato una concentrazione pari a 0,2 ml dalla soluzione  $1 \times 10^{-3}$  M e abbiamo aggiunto 4,8 ml di DMEM per raggiungere il volume desiderato, corrispondente a 5 ml.

### *6.3.6 Allestimento terreni di coltura*

La composizione del terreno di crescita per entrambe le linee cellulari, come stabilito dalla ditta InvivoGen, è la seguente: DMEM supplementato con 4,5 g/l di glucosio, 10% di siero fetale bovino, penicillina (50 U/ml), streptomicina (50 µg/ml), Normocina (100 µg/ml) e 2 mM di L-glutamina. Tuttavia, le cellule HTLR7 e le cellule Null necessitano della presenza di diversi antibiotici selettivi e di conseguenza sono stati allestiti due diversi terreni di subcoltura.

Al terreno delle cellule HTLR7, oltre alla Normocina, sono state aggiunte la Blasticidina (10 µg/ml) e la Zeocina (100 µg/ml) come antibiotici selettivi, necessari per il mantenimento delle sole cellule che codificano per il gene hTLR7 e per il gene reporter SEAP. Tale terreno di subcoltura è stato denominato BZN.

Le cellule Null, invece, sono state lasciate crescere in un terreno di subcoltura a cui è stato addizionato, come antibiotico selettivo, la Zeocina (100 µg/ml) indispensabile per il mantenimento delle sole cellule che esprimono il gene reporter SEAP. Questo terreno di subcoltura è stato chiamato ZN.

### *6.3.7 Preparazione campioni*

Dopo aver calcolato le varie concentrazioni dei campioni, sia per quanto riguarda le sonde sia per i farmaci, e dopo aver allestito il terreno di coltura per le due linee cellulari, cellule HTLR7 e cellule Null, abbiamo preparato due diverse piastre multiwell da 96 pozzetti per ciascun tipo di cellula. In ogni pozzetto troviamo circa  $10^5$  cellule, che abbiamo analizzato in tre tempi differenti, a tempo 0 ( $t=0$ ), dopo 6 ore ( $t=6$ ) e dopo 20 ore ( $t=20$ ), affinché potessimo osservare nel tempo le interazioni che i farmaci hanno in un sistema cellulare, sia quando non hanno ancora raggiunto la membrana, sia quando la raggiungono in modo da poter studiare i loro effetti biologici all'interno della cellula.

I campioni, inoltre, si distinguono in:

- "Bianchi", ovvero i campioni di controllo, costituiti dal terreno di coltura e la sonda, per poter osservare le interazioni tra il CAT8, CAT16 e 5DSA con i terreni BZN o ZN,
- Campioni di controllo per le linee cellulari, contenenti terreno, cellule e sonda,
- Campioni con sistema binario sonda-farmaco, costituiti dal terreno, la sonda e i farmaci,
- Campioni con il sistema ternario sonda-farmaco-cellule, costituiti, quindi, da terreno di coltura, la sonda, il farmaco e la linea cellulare (HTLR7 o Null).

#### *Preparazione campioni sonda 5DSA*

- 5DSA  $5 \times 10^{-4}$  M+ terreno Bzn
- 5DSA 1 $\mu$ L + terreno Zn 199 $\mu$ L
- 5DSA 1 $\mu$ L + terreno Bzn 149 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco
- 5DSA 1 $\mu$ L + terreno Zn 149 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco
- 5DSA 1 $\mu$ L + terreno Bzn 99 $\mu$ L + 100 $\mu$ L di cellule HTLR7
- 5DSA 1 $\mu$ L + terreno Zn 99 $\mu$ L + 100 $\mu$ L di cellule Null
- 5DSA 1 $\mu$ L + terreno Bzn 49 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco + 100 $\mu$ L di cellule HTLR7
- 5DSA 1 $\mu$ L + terreno Zn 49 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco + 100 $\mu$ L di cellule Null

#### *Preparazione campioni sonda CAT8*

- CAT8 50  $\mu$ L + terreno Bzn 150 $\mu$ L
- CAT8 50  $\mu$ L + terreno Zn 150 $\mu$ L

- CAT8 50  $\mu$ L + terreno Bzn 100 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco
- CAT8 50  $\mu$ L + terreno Zn 100  $\mu$ L + 100 $\mu$ L di farmaco
- CAT8 50  $\mu$ L + terreno Bzn 50 $\mu$ L + 100 $\mu$ L di cellule HTLR7
- CAT8 50 $\mu$ L + terreno Zn 50 $\mu$ L + 100 $\mu$ L di cellule Null
- CAT8 50  $\mu$ L + terreno Bzn 50 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco + 50 $\mu$ L di cellule HTLR7
- CAT8 50  $\mu$ L + terreno Zn 50 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco + 50 $\mu$ L di cellule Null

#### *Preparazione campioni CAT16*

- CAT16 50  $\mu$ L + terreno Bzn 150 $\mu$ L
- CAT16 50  $\mu$ L + terreno Zn 150 $\mu$ L
- CAT16 50  $\mu$ L + terreno Bzn 100 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco
- CAT16 50  $\mu$ L + terreno Zn 100  $\mu$ L + 100 $\mu$ L di farmaco
- CAT16 50  $\mu$ L + terreno Bzn 50 $\mu$ L + 100 $\mu$ L di cellule HTLR7
- CAT16 50 $\mu$ L + terreno Zn 50 $\mu$ L + 100 $\mu$ L di cellule Null
- CAT16 50  $\mu$ L + terreno Bzn 50 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco + 50 $\mu$ L di cellule HTLR7
- CAT16 50  $\mu$ L + terreno Zn 50 $\mu$ L + 50 $\mu$ L di farmaco + 50 $\mu$ L di cellule Null

### 6.3.8 Detection kit

Kit impiegato nella valutazione della secrezione del gene reporter SEAP che permette di monitorare l'effettiva trasfezione cellulare e l'attività subcellulare.

Per la linea cellulare HEK-Blue HTLR7 è prevista una sospensione cellulare di 220.000 cell per ml di HEK-Blue Detection, di questi vengono prelevati e piastrati 180 microlitri (circa 40.000 cell per well), mentre per la linea cellulare HEK-Blue Null è prevista una sospensione cellulare di 280.000 cell per ml di HEK-Blue Detection, di questi ne vengono prelevati e piastrati 180 microlitri (circa 50.000 cell per well).

Entrambe le linee cellulari sono state trattate con i quattro diversi farmaci, come controlli sono state utilizzate cellule delle medesime sospensioni non trattate (aggiunta di acqua e PBS). La concentrazione finale dei farmaci per ogni linea cellulare è pari a  $1 \times 10^{-5}$  M. Le piastre contenenti i campioni sono state incubate a 37° C in 5% di CO<sub>2</sub> per 6/16 ore, la presenza di SEAP è stata osservata ad occhio nudo, dato che l'idrolisi del substrato da parte della SEAP produce un colore porpora/blue nelle HTLR7, come è possibile vedere nella figura sottostante, confermando la buona riuscita della trasfezione.

### 6.3.9 Analisi della citotossicità dei farmaci (mediante Trypan Blue)

Il marker aggiunto alle due sospensioni cellulari è in grado di alterare esclusivamente le membrane cellulari la cui integrità è stata modificata in maniera significativa. Esso penetra nelle cellule danneggiate, la cui vitalità è compromessa, dando loro un colore blu al microscopio a luce visibile, mentre le cellule vitali che non sono permeabili al marker rimangono trasparenti.

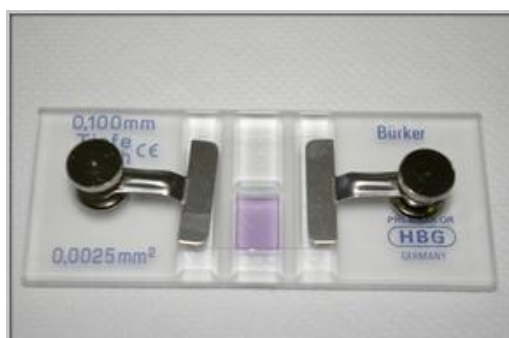
Le due linee cellulari HEK-Blue HTLR7 E le Null sono state piastrate in terreno completo, alla concentrazione di 100000 cellule per well; trattate con concentrazioni di sonde paramagnetiche finali pari a  $5 \times 10^{-4}$  M, e con farmaci ad una concentrazione finale pari ad  $1 \times 10^{-5}$ , come

controlli sono state utilizzate cellule non trattate. La valutazione della vitalità è stata riportata per i tre diversi tempi rispettivamente  $t=0$ ,  $t=6$  e  $t=20$  ore.

Dei campioni di cellule trattate solo 25  $\mu\text{l}$  sono stati aggiunti a 25  $\mu\text{l}$  di TB; di questa nuova sospensione, 10  $\mu\text{l}$  sono stati contati al microscopio mediante l'ausilio della Cameretta Burker.

#### *6.3.10 Calcolo per la conta mediante Camera di Burker*

Sono stati prelevati 25  $\mu\text{l}$  di sospensione cellulare, i quali sono stati opportunamente diluiti 1:2 con il colorante Trypan Blue, aggiungendo pertanto un volume uguale di colorante. Dopo opportuna risospensione mediante l'ausilio di un'apposita pipetta, sono stati prelevati 10  $\mu\text{l}$  della sospensione ottenuta, che è generalmente il volume che sta nella camera di conta.



**Figura 43:** *esempio di Cameretta di Burker*

Dopo opportuna osservazione al microscopio, si esegue il seguente calcolo:

$$N \text{ cell contate} \times \text{ml sospensione} \times 2 \text{ diluizione} \times 10^4$$

dove il numero di cellule corrisponde al numero di cellule medio, cioè ottenuto sommando tutte le cellule contate divise per il numero dei quadrati contati.



**RISULTATI E DISCUSSIONE**

---

*Prima linea di ricerca: farmaci dendrimerici con gruppi maltosio e solfato complessati con ioni rame per la cura dell'Alzheimer*

Come descritto, l'aggregazione del peptide amiloide è considerata responsabile della formazione delle placche senili che impediscono la comunicazione con il cervello nei malati di Alzheimer. Il sito attivo responsabile della suddetta aggregazione si trova nella sequenza del peptide amiloide A $\beta$  1-40, che abbiamo quindi selezionato per i nostri studi. Poiché la complessazione con ioni Cu(II) di tali peptidi sembra rivestire un ruolo fondamentale nel processo patologico, abbiamo complessato i peptidi con Cu(II) in quantità molari relative diverse per verificare il tipo di complessi che si formano ed il loro range di stabilità. Abbiamo poi aggiunto il dendrimero PPI-maltosio, funzionalizzato con gruppi solfato per facilitare la complessazione con gli ioni Cu(II). Infatti è stato prima studiato il sistema binario dendrimero/ Cu(II) per verificare anche in questo caso la formazione di complessi a diverso range di stabilità in funzione del rapporto molare. Poi abbiamo studiato il sistema ternario dendrimero/peptide/Cu. Le ipotesi, da verificare, di azione farmacologica del dendrimero per la cura dell'Alzheimer infatti sono tre: (a) una interazione diretta del dendrimero con il peptide impedendone l'aggregazione (b) la complessazione degli ioni Cu(II) da parte del dendrimero in modo tale da sottrarre tali ioni all'interazione con il peptide in considerazione del fatto che i complessi peptide-Cu(II) sono ritenuti responsabili della patologia; (c) la riduzione degli ioni Cu(II) per trasferimento elettronico da gruppi azotati o, più raramente, ossigenati. Mediante analisi EPR sono stati analizzati i diversi sistemi:

- un primo sistema caratterizzato dalle interazioni esistenti tra il Cu(II) a diverse concentrazioni e PPI-SO<sub>3</sub> G5maltosio a concentrazione fissa (*sistema binario Cu(II)/PPI-SO<sub>3</sub> maltosio*);
- un sistema interagente costituito da Cu(II) a diverse concentrazioni del peptide A $\beta$ 1-40 a concentrazione fissa (*sistema binario Cu(II)/A $\beta$* );
- un ultimo sistema interagente formato da Cu(II) a diverse concentrazioni, peptide A $\beta$ 1-40 e PPI-SO<sub>3</sub>G5maltosio a concentrazioni fisse (*sistema ternario Cu/A $\beta$ /PPI*).

Per analizzare le effettive differenze spettrali e ottenere le intensità relative dei picchi delle componenti x, y e z di ogni singolo spettro, sono stati calcolati i valori di campo relativi alle tre componenti.

Sulla base dei parametri riportati in Tabella 1, sono stati stimati i parametri magnetici di partenza per poter effettuare le simulazioni spettrali ed identificare la presenza di più componenti caratterizzanti gli spettri.

Per gli spettri caratterizzati dalla presenza di più componenti, tramite sottrazione spettrale, è possibile estrarre ciascuna componente, quantificarla ed effettuare la simulazione spettrale affinché si ottengano i parametri informativi di struttura e dinamica dei complessi formati dagli ioni Cu(II).

I parametri spettrali ottenuti dalla simulazione sono riportati in Tabella 2, fondamentali per l'individuazione dei tipi di coordinazione degli ioni rame rispetto al dendrimero in esame, tali valori vengono poi confrontati con valori di riferimento presenti in letteratura.

Tabella 1

CAMPIONIA BASSA TEMPERATURA INH <sub>2</sub> O	(MASSIMI) ComponentiAzz					(MINIMI) Valore di gxx	
Cu <sub>0,3</sub> +PPIG50,1	x=2602,2062	x=272,02206	x=2845,4250 5	x=2993,1213 3		x=3253,7313 4	
	y=0,04666	y=0,06910	y=0,11360	y=0,20602		y=-0,790081	
Cu <sub>0,2</sub> +PPIG5 0,1	x=2604,2829 3	x=2723,6859 2	x=2849,8377	x=2984,2959 1		x=3253,7313 4	
	y=0,044692	y=0,064131	y=0,0915740	y=0,1497366 8		y=-0,813943	
Cu <sub>0,1</sub> +PPIG5 0,1	x=2678,0013	x=2886,6969	x=3001,6872 2	x=3221,0253 1		x=3253,7313 4	x=3279,6885 1
	y=0,12764	y=0,2261	y=0,242129	y=0,347103		y=-0,511702	y=-0,65166
Cu <sub>0,04</sub> +PPIG50,1	x=2617,2615 2	x=2699,8053 2	x=2908,2614	x=2990,7852	x=3218,9487 3	x=3275,5353 7	x=3316,8072 7
	y=0,12465	y=0,13069	y=0,21664	y=0,25506	y=0,31553	y=-0,534142	y=-0,67106
Cu <sub>0,02</sub> +PPIG50,1	x=2697,7287 5	x=2866,9695	x=3006,0999 4	x=3218,9487 3		x=3277,6119 4	x=3316,8072 7
	y=0,073844	y=0,156348	y=0,206202	y=0,317846		y=-0,5605617	y=-0,677823
Cu <sub>0,01</sub> +PPIG50,1	x=2697,7287 5	x=2895,2628	x=3053,8611 3	x=3218,9487 3		x=3284,1012 3	x=3334,1985 7
	y=0,18165	y=0,18507	y=0,194587	y=0,3760093		y=-0,330661	y=-0,636073
Cu <sub>0,005</sub> +PPIG50, 1	x=2654,1207	x=2904,0882 5	x=3010,5126 5	x=3223,3614 5		x=3262,9972 1	x=3327,4497 1

	y=0,281802	y=0,47717	y=0,281802	y=0,27852		y=-0,38952	y=-0,530017
Cu <sub>0,002</sub> +PPIG50,1	x=2697,728 75	x=2888,7735 2	x=3029,980 53	x=3221,025 31		x=3275,53537	x=3318,88384
	y=0,137156	y=0,2421299	y=0,194587	y=0,360035		y=-0,536202	y=-0,636073
Cu <sub>0,02</sub> +PPIG50,2	x=2699,805 32	x=2862,8163 5	x=3079,818 3	x=3218,948 7		x=3275,5353	x=3320,96042
	y=0,11509	y=0,1306904	y=0,17215	y=0,3566		y=-0,51512	y=-0,642159
Cu <sub>0,02</sub> +PPIG50,1	x=2615,184 9	x=2895,2628	x=3006,099 94	x=3212,459 44		x=3277,61194	
	y=0,113604	y=0,511638	y=0,161146 87	y=0,269543 5		y=-0,60561732	
Cu <sub>0,02</sub> +PPIG50,05	x=2580,402 34	x=2695,3926	x=2917,066 84	x=3216,948 73		x=3273,19922	x=3307,98183
	y=0,15959	y=0,172147	y=0,28662	y=0,353569		y=-0,6265	y=-0,613633
Cu <sub>0,02</sub> +PPIG50,02	x=2610,772 23	x=2706,2646 1	x=29127,96 885	x=3192,991 56		x=3244,90591	x=3276,68851
	y=0,165681	y=0,165681	y=0,325043	y=0,344060 84		y=-0,353763	y=-0,639116442
Cu <sub>0,1</sub> +ab0,02	x=2990,785 2					x=3242,82933	

	y=0,4096					y=-0,5866	
Cu0,04+ab0,02	x=2995,19792					x=3221,0253	
	y=0,456699					y=-0,543943	
Cu0,02+ab 0,02	x=2704,21804	x=2736,6645	x=3055,9377	x=3218,94873		x=3284,10123	x=3318,88384
	y=0,256348	y=0,320947	y=0,18578	y=0,382387		y=-0,448624	y=-0,618899
Cu0,01+ab0,02	x=2667,35886	x=2880,20766	x=3101,62232	x=3221,02531		x=3247,24205	x=3318,88384

	y=0,292042	y=0,367407	y=0,408777	y=0,466939		y=-0,448624	y=-0,618899
Cu0,002+ab0,02	x=2717,19663	x=2919,16341	x=3101,62232	x=3221,02531		x=3290,59053	x=3320,96042
	y=0,13069046	y=0,255061	y=0,31211	y=0,366500		y=-0,4736688	y=-0,62314218
Cu0,02+ab0,02+ PPIG50,1	x=2749,90266	x=2899,67534	x=2984,29391			x=3025,56781	x=3069,17589
	y=0,37861	y=0,4930953	y=0,566500			y=-0,33110	y=-0,391574
Cu0,02+ab0,02+ PPIG50,05	x=2671,51201	x=2806,22972	x=2895,26282	x=3001,68722		x=3060,35042	
	y=0,48358	y=0,42007	y=0,29912	y=0,20669		y=-0,5186	
Cu0,02+ab0,02+ PPIG5 0,02	x=2669,43543	x=2862,81635	x=2984,2959	x=3221,02531		x=3275,5353	x=3316,80725
	y=0,22685	y=0,23282	y=0,32375	y=0,38554		y=-0,46617	y=-0,5953
<b>BIANCHI</b>							
BnCu 0,3	x=2649,96755	x=2667,35886	x=2990,7852			x=3214,5360	
	y=0,03522	y=0,04874	y=0,45669			y=-0,5402	
BnCu 0,2	x=2988,70863					x=3240,7527	
	y=0,39994					y=-0,5866	
BnCu 0,1	x=22599,8702	x=2736,7645	x=2860,48021	x=2993,12135		x=3264,6335	

	y=0,07861	y=0,10713	y=0,171035	y=0,21211		y=-0,783618	
BnCu 0,04	x=2962,75146					x=2825,6976	
	y=0,534523					y=-0,47715	
BnCu 0,02	x=2956,26217					x=2812,71901	
	y=0,34710356					y=-0,66459	
BnCu 0,01	x=3014,6658					x=2812,71901	

	y=0,547103					y=-0,486658	
BnCu 0,005	x=2586,89163	x=282362103				x=2973,73005	
	y=0,49005	y=0,5665				y=-0,35125	
BnCu 0,002	x=2973,3939					x=2821,54445	
	y=0,537595					y=-0,4771504	
Bnab	x=3001,68722					x=2782,34912	
	y=0,550526					y=-0,474107	
Bn PPIG50,1	x=2958,33874					x=2801,817	
	y=0,591603					y=-0,429607	

CAMPIONIA BASSA  TEMPERATURAIN  H <sub>2</sub> O	MASSIMI ComponentiAzz					MINIMI  Valore di  gxx	
Cu0,02+ PPIG50,1	x=2708,6307	x=2877,8715	x=3042,95912	x=3203,634		x=3276,6885	x=3325,37313
	y=0,1444	y=0,15318	y=0,18548	y=0,29713		y=-0,3755	y=-0,7073
CU 0,02+PPIG5  0,05	x=2671,51201	x=2938,8708	x=3014,6658	x=3208,04672		x=3282,0246	x=3312,39455
	y=0,17214	y=0,2645	y=0,2805	y=0,32504		y=-0,67106	y=-0,6645
Cu0,02+PPIG5 0,02	x=2604,28293	x=2717,1966	x=2847,50162	x=3153,79624		x=3249,3186	x=3266,7099
	y=0,05959	y=0,66581	y=0,11056	y=0,164569		y=-0,81214	y=-0,81214
Cu0,02+ab 0,02	x=3021,4146					x=3234,26347	
	y=0,4866					y=-0,51214	
Cu0,02+ab0,02+  PPIG50,1	x=2708,6307	x=2880,2076	x=3060,3504	x=3212,45944		x=3282,0246	x=3338,35172
	y=0,07214	y=0,0850	y=0,0945	y=0,2665		y=-0,30971	y=-0,72656
Cu0,3+PPIG50,1	x=2606,35951	x=27324,5879	x=3001,68722			x=3255,8079	
	y=0,05008	y=0,08507	y=0,25356			y=-0,7486	

Cu0,2+PPIG50,1	x=2606,35951	x=2741,0772	x=3004,0233			x=3255,80792	
	y=0,047513	y=0,0885	y=0,29432			y=-0,71012	
Cu0,1+PPIG50,1	x=2602,2062	x=2726,0221	x=2843,0889	x=2990,7852	x=3177,676	x=3253,73134	

	y=0,04666	y=0,05959	y=0,07214	y=0,1136	y=0,19005	y=-0,80605	
Cu0,04+ PPIG5 0,1	x=2602,2062	x=2721,60934	x=2838,9357	x=3186,50227		x=3251,65477	
	y=0,05617	y=0,05959	y=0,07214	y=0,24406		y=-0,75166	
Cu0,01+ PPIG50,1	x=2701,8818	x=2893,18624	x=3058,2738	x=3210,3828		x=3279,6885	x=3327,44971
	y=0,14362	y=0,13411	y=0,16568	y=0,360035		y=-0,4641	y=-0,6391164
Cu0,005+PPIG50,1	non leggibile						
Cu0,002+PPIG50,1	x=2784,4254	x=2934,45814	x=3064,7314	x=3208,04672			
	y=0,27524	y=0,19291	y=0,17899	y=0,47717			
<b>Bianchi</b>							
BnCu0,02	x=2995,19792					x=3145,2303	x=3162,3621
	y=0,449736					y=-0,49233	y=-0,523464
BnCu 0,02+ab0,02	x=3075,665					x=3255,8079	

	y=0,2640					y=-0,24656	
Bnab	x=2973,3939					x=2828,03374	
	y=0,45997					y=-0,382972	
Bn PPIG5 0,1	x=2741,07772					x=3353,6664	x=3390,52563
	y=0,51857					y=-0,474107	y=-0,4836161
CAMPIONIA	MASSIMIComponenti					MINIMI	
T.	Azz					Valore di gxx	
AMBIENTE IN							
BUFFER							
Cu0,01+ab0,02	x=2597,79364	x=2758,46853	x=2836,5996			x=3001,68722	
	y=0,4485956	y=0,506026	y=0,464569			y=0,49008	
Cu0,002+ab0,02	x=2612,8488	x=2871,38222				x=3284,10123	
	y=0,356056	y=0,41468				y=-0,47214	
Cu0,02+ab0,02+PPIG5 0.1	non leggibile						
Cu0,02+ab0,02+	x=2710,7073	x=2769,37054	x=2838,93976	x=3214,53602		x=3271,12265	

PPIG5 0,05	y=0,36740	y=0,41574	y=0,44645	y=-0,29900		y=-0,49929	
Cu0,02+ab0,02+	x=2730,1752	x=2845,42505	x=3162,3621			x=3295,0032	
PPIG5 0,02	y=0,341018	y=0,37258	y=0,31211			y=-0,63607	
BnCu 0,04	x=2953,92602					x=2847,50162	
	y=0,518578					y=-0,423142	
BnCu 0,02	x=2980,14276					x=2821,5444	
	y=0,52808					y=-0,41667	
BnCu 0,01	x=2975,73005					x=2843,0889	
	y=0,50602					y=-0,486658	
BnCu 0,005	x=2980,14276					x=2828,00334	
	y=0,54406					y=-0,45166	
BnCu 0,002	x=2982,21934					x=2808,5658	
	y=0,480544					y=-0,509098	

Bnab	x=2977,8066					x=2788,8384	
	y=0,412053					y=-0,5439438	
Bn PPIG5 0,1	x=2988,70863					x=2819,20831	
	y=0,37437					y=-0,358806	
<b>CAMPIONIA</b>	<b>MASSIMI ComponentiAzz</b>					<b>MINIMI</b>	
<b>TEMPERATURA</b>						<b>Valoredi</b>	
<b>AMBIENTEIN</b>						<b>gxx</b>	
Cu0,02+PPIG5 0,1	x=2747,5665	x=2869,30565	x=3017,0019	x=3214,53602		x=3316,80727	
	y=0,24555	y=0,33112	y=0,30906	y=0,28054		y=-0,65509	
Cu0,02+PPIG5 0,05	x=2608,6956	x=2745,4899	x=2973,3939			x=3116,93705	
	y=0,13671	y=0,20365	y=0,51857			y=-0,48361	
Cu0,02+PPIG5 0,02	x=2982,2193					x=3123,46635	
	y=0,4712					y=-0,51214	

Cu0,02+ab0,02	x=2986,63206					x=3125,5029	
	y=0,50602					y=-0,49654	

Cu0,02+ab 0,02+ PPIG5 0,1	x=2721,6093 4	x=2888,7735 2	x=3055,9377	x=3214,5360 2		x=3275,5353 7	
	y=0,0770	y=0,97366	y=0,114921	y=0,29116		y=-0,21658	
Cu0,3+PPIG50,1	x=2984,29591					x=3125,5092	
	y=0,50602					y=-0,49654	
Cu0,2+PPIG5 0,1	x=2982,21934					x=3125,5029	
	y=0,50260					y=-0,50263	
Cu0,1+PPIG50,1	x=2986,29591					x=3125,5029	
	y=0,52504					y=-0,47715	
Cu0,04+PPIG50,1	x=2982,21934					x=2127,8390 7	
	y=0,49613					y=-0,49654	
Cu0,01+PPIG50,1	x=2602,2063	x=2702,6307	x=2853,9909	x=3073,3201	x=3194,1447 1	x=3277,6119	x=3323,2965 6
	y=0,1105	y=0,1611	y=0,180544	y=0,10713	y=0,279052	y=-0,33519	y=-0,7201
Cu0,005+PPIG50, 1	x=2719,2732	x=2875,7949	x=3077,7417 3	x=3205,9701		x=3269,0460 7	x=3331,862
	y=0,30620	y=0,27074	y=0,34131	y=0,40590		y=-0,228496	y=-0,5985
Cu0,002+PPIG50, 1	x=2797,6638 5	x=2899,675	x=3138,4815 1	x=3227,7741		x=3273,1992 2	x=3347,1771
	y=0,405909	y=0,291456	y=0,25318	y=0,35886		y=-0,41352	y=-0,60405

BnCu0,02	x=2986,6320					x=3119,01363	
	y=0,473902					y=-0,5337	
Bnab	x=2990,7852					x=2838,93576	
	y=0,456699					y=-0,54722	
Bn PPIG5 0,1	x=2953,92602					x=2823,62103	
	y=0,33996					y=-0,5509	



Tabella 2

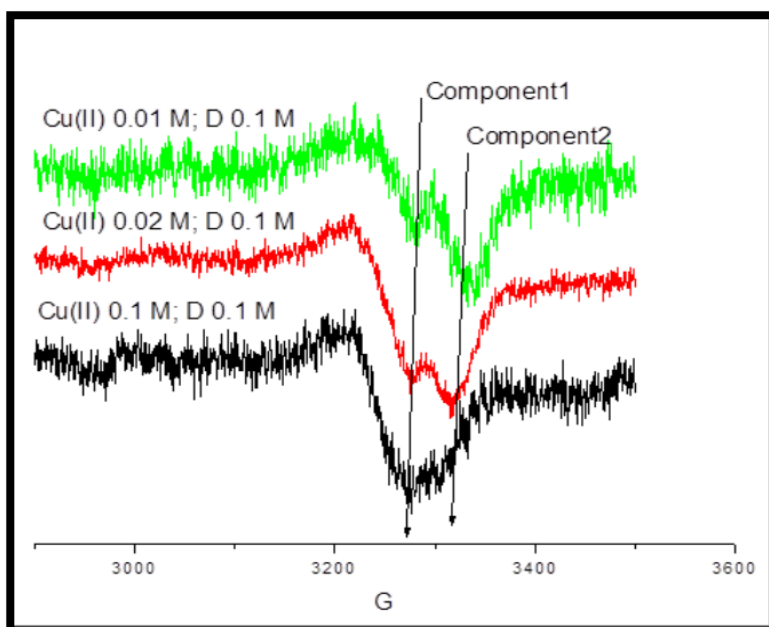
Campioni	%	gxx	gyy	gzz	Azz(G)
Cu0.3+PPIG50.1	100	2.06	2.065	2.388	125
		--	--	--	--
Cu0.2+PPIG50.1	100	2.06	2.065	2.388	125
		--	--	--	--
Cu0.1+PPIG50.1	20	2.016	2.045	2.255	169
	80	2.04	2.04	2.3	141
Cu0.04+PPIG50.1	45	2.016	2.045	2.255	169
	55	2.04	2.04	2.3	141
Cu0.02+PPIG50.1	60	2.016	2.045	2.255	169
	40	2.04	2.04	2.3	141
Cu0.01+PPIG50.1	80	2.015	2.045	2.24	178
	20	2.04	2.04	2.3	141
Cu0.005+PPIG50.1	100	2.015	2.045	2.24	178
		--	--	--	--
Cu0.002+PPIG50.1	100	2.015	2.045	2.24	178
		--	--	--	--
Cu0.02+PPIG50.2	80	2.015	2.045	2.24	178
	20	2.04	2.04	2.3	141
Cu0.02+PPIG50.05	45	2.016	2.045	2.255	169
	55	2.04	2.04	2.3	141

Cu0.02+PPIG50.02	20	2.016	2.045	2.255	169
	80	2.04	2.04	2.3	141
Cu0.1+Aβ0.02	100	2.065	2.065	2.4	121
		--	--	--	--
Cu0.04+Aβ0.02	100	2.065	2.065	2.4	121
		--	--	--	--
Cu0.02+Aβ0.02	60	2.013	2.03	2.27	170
	40	2.04	2.04	2.23	159
Cu0.01+Aβ0.02	55	2.013	2.03	2.27	170
	45	2.04	2.04	2.23	159
Cu0.002+Aβ0.02	65	2.013	2.03	2.27	170
	35	2.04	2.04	2.23	159
Cu0.02+Aβ0.02+ PPIG50.1	Intensità nulla				
Cu0.02+Aβ0.02+ PPIG50.05	Intensità nulla				
Cu0.02+Aβ0.02+ PPIG50.02	60	2.013	2.03	2.27	170
	40	2.04	2.04	2.23	159
Cu0.02+Aβ0.02+ PPIG5 0.1(Water)		2.01	2.04	2.242	177

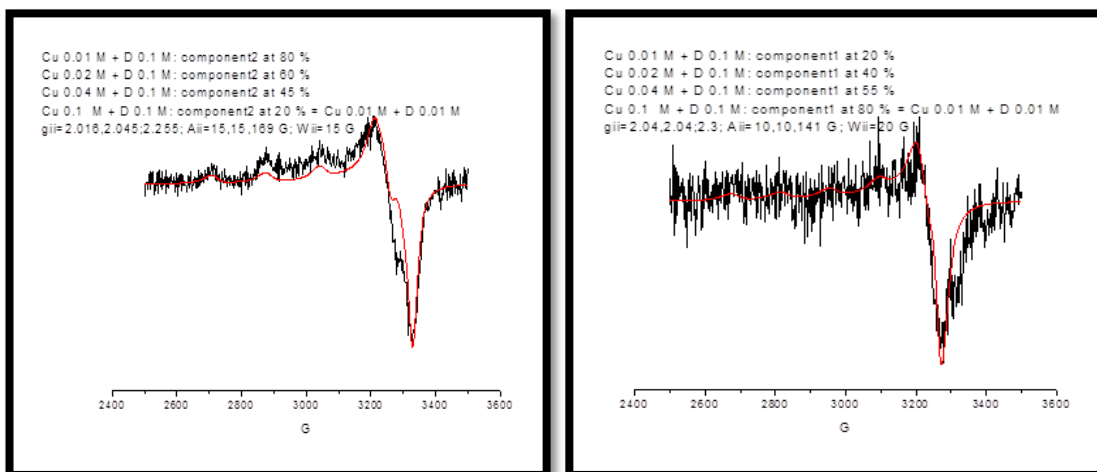
Lo studio dei parametri spettrali e delle percentuali relative alle diverse componenti spaziali ottenute hanno permesso di ottenere differenti informazioni; in generale gli spettri sono caratteristici di complessi quadrato-planari o ottaedrici.

- *Sistema binario Cu(II)/PPI-SO<sub>3</sub> maltosio:*

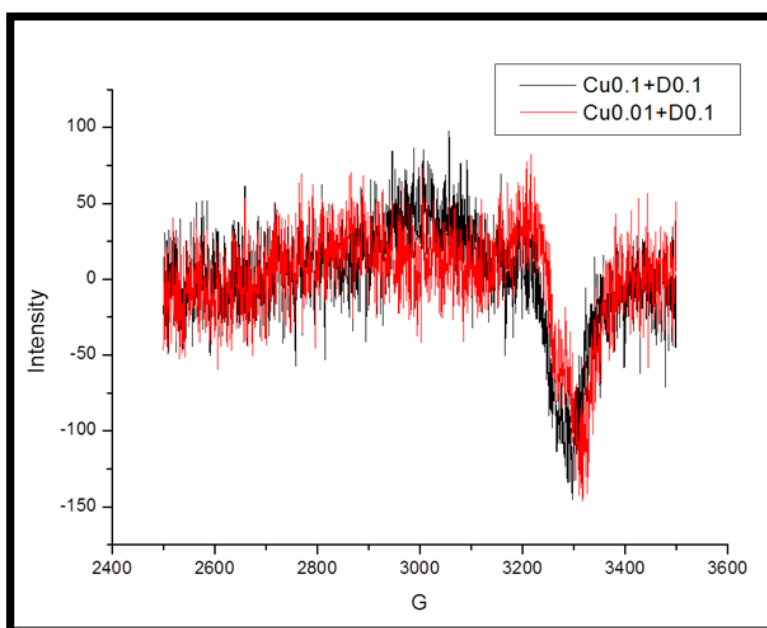
è caratterizzato dalla presenza di due componenti spettrali, indicate come *Componente 1*, i cui parametri magnetici se confrontati con quelli presenti in letteratura, indicano una coordinazione Cu-NO<sub>3</sub> (un sito azotato e tre siti ossigenati), e come *Componente 2*, i cui parametri magnetici indicano una coordinazione Cu-N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che diventa Cu-N<sub>3</sub>O/Cu-N<sub>4</sub> alle concentrazioni inferiori di Cu(II).



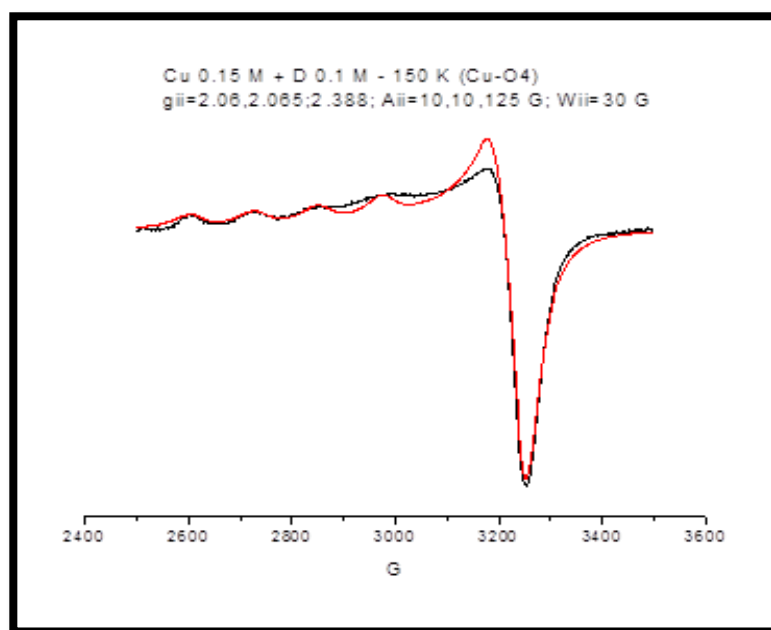
-La *Componente 2* aumenta rispetto alla *Componente 1*, all'aumentare del rapporto PPI/Cu(II), ovvero quando la concentrazioni del rame diminuisce. Tale variazione è mostrata in figura soprastante. Ciò indica che a basse concentrazioni di ioni rame vengono occupati siti di coordinazione ricchi di gruppi azotati (presenti all'interno del PPI) e, solo dopo saturazione di questi, vengono occupati siti di coordinazione ricchi di gruppi ossigenati (presenti sulla superficie dendrimerica).



-L'intensità spettrale non segue l'andamento della concentrazione del Cu(II), anzi a concentrazioni elevate di ioni rame, gli spettri sono di debole intensità in quanto la saturazione corrisponde a aumentare la concentrazione locale di ioni che si “annichiliscono” per effetto di interazioni spin-spin. In un rapporto  $PPI/Cu(II) \geq 20$  è visibile esclusivamente la *Componente 2*, che tuttavia si modifica indicando un ulteriore arricchimento di siti azotati (da Cu-N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> a Cu-N<sub>3</sub>O/Cu-N<sub>4</sub>) quando la concentrazione di Cu(II) è molto bassa.



-Una terza componente, *Componente 3*, compare e guadagna in intensità solo quando la concentrazione di ioni rame supera quella dei siti superficiali del dendrimero. Questa componente ha parametri magnetici che indicano una coordinazione esclusiva con i soli gruppi ossigenati ( $\text{Cu-O}_4$ ), che possono essere sia i gruppi solfato che le molecole di solvente.



-La coordinazione  $\text{Cu-O}_4$  si differenzia dalle altre due non solo per i parametri magnetici e per l'aumento dell'intensità spettrale, ma anche perché mostra un significativo aumento di mobilità a temperatura ambiente. Diversamente dalla coordinazione  $\text{Cu-O}_4$ , le *Componenti 1* e *2*, relative ai complessi che includono i siti azotati, mostrano piccole variazioni di mobilità con l'aumento della temperatura da 150 K a 298 K, il che dimostra che gli ioni sono intrappolati in una struttura compatta e poco flessibile.

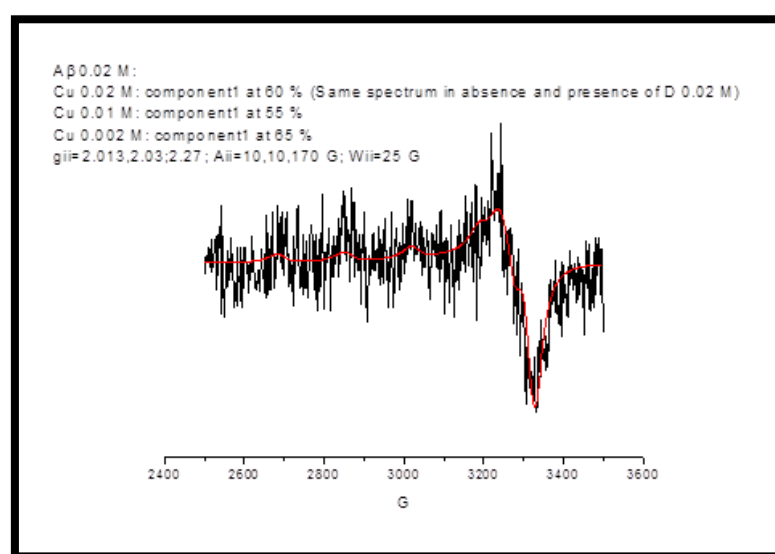
-Gli spettri in acqua sono più intensi di quelli in tampone, in quanto il tampone PBS evita la protonazione dei siti di interazione e facilita quindi le suddette interazioni. Comunque gli spettri in acqua sono molto simili a quelli in tampone, ma si differenziano da questi ultimi in quanto sono caratterizzati da una coordinazione  $\text{Cu-O}_4$  già a basse concentrazioni di ioni rame; ciò indica che i siti azotati interni del dendrimero sono

protonati già ad un pH naturale.

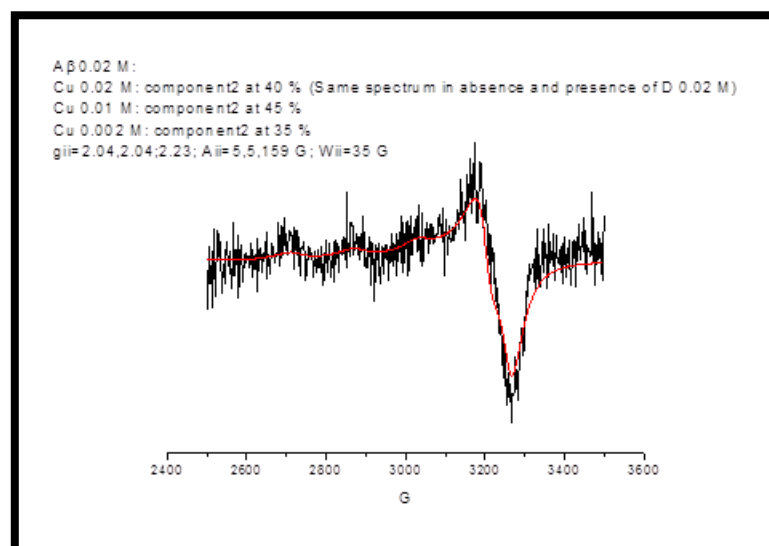
- *Sistema binario Cu(II)/A $\beta$ :*

Le componenti spettrali sono due e sono identificabili con quelle che vengono riportate in letteratura per le quali viene definita la seguente corrispondenza strutturale:

-*Componente 1*  $g_{zz}=2.27$ ,  $A_{zz}= 170$  G. La coordinazione del rame indicata in letteratura per la *Componente 1* è NH<sub>2</sub>(D1), CO(D1-A2), Nim(H6), Nim(H13 o H14).



-*Componente 2*  $g_{zz}=2.23$ ,  $A_{zz}= 159$  G. La coordinazione del rame indicata in letteratura per la *Componente 2* è NH<sub>2</sub>(D1), N-(DI-A2), CO(A2-E3), Nim. Variando la concentrazione del rame, la quantità relativa alle due componenti varia di poco e comunque risulta sempre maggioritaria la *Componente 1* che implica una coordinazione più stretta con i gruppi imidazolici.



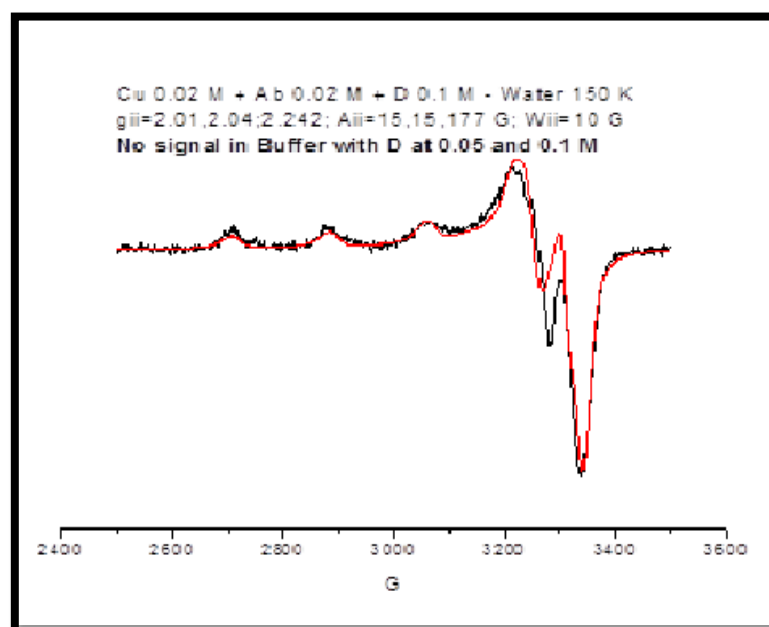
Dall'analisi degli spettri in buffer si osserva una ridotta intensità, dovuta all'aumento di concentrazione locale di ioni Cu(II) su siti non protonati; infatti, al contrario, in acqua gli spettri sono caratterizzati da un'elevata intensità già a concentrazioni di rame pari allo 0.02 M, con una percentuale di coordinazione Cu-O<sub>4</sub> che indica una protonazione dei siti A $\beta$ .

- *Sistema ternario Cu/A $\beta$ /PPI:*

Aggiungendo concentrazioni pari o uguali a 0.002 M di PPI al sistema Cu/A $\beta$  non si notano cambiamenti a livello spettrale, indicando che il dendrimero a tale concentrazione non è in grado di perturbare il sistema Cu/A $\beta$ ; al contrario, a concentrazioni maggiori di dendrimero il segnale EPR sparisce. Questo non si verifica nei sistemi binari, per questo i motivi che generano questo effetto devono essere correlati all'effetto dell'aggiunta del dendrimero al complesso Cu(II)-peptide. Tuttavia, se il dendrimero fosse in grado di estrarre il rame dal peptide per legarlo a sé dovremmo vedere lo spettro identico a quello del sistema binario Cu(II)/PPI, e invece non è presente.

Ciò è probabilmente dovuto all'aumento di concentrazione locale del Cu(II) che rimane intrappolato all'interfase

dendrimer/peptide. Sostituendo il buffer con l'acqua lo spettro ricompare, mostrando una forte interazione tra il rame e i siti azotati del dendrimer. Quindi possiamo descrivere quanto avviene in soluzione considerando che l'aggiunta del dendrimer in condizioni di bassa protonazione (buffer) porta ad una interazione dendrimer-peptide che concentra gli ioni rame all'interfase. In acqua la protonazione del peptide impedisce l'interazione dendrimer-peptide e rimette i siti dendrimerici a disposizione degli ioni Cu(II).



Il tampone è quindi il responsabile dell'estrusione degli ioni rame dai siti di interazione del dendrimer e del peptide, probabilmente a causa della variazione dell'ionicità delle molecole superficiali in soluzione che tendono a comprimere l'interfase. Non si è però osservata una totale sparizione dello spettro del rame impegnato nella complessazione Cu/A $\beta$  fino a quando il rapporto molare fra dendrimer e il suddetto complesso non ha superato il valore di 1:1.



- Quindi in assenza del tampone, lo spettro riappare confermando che la presenza del PBS favorisce l'interazione tra il dendrimero e il peptide, a seguito di reazioni di protonazione e deprotonazione. Il peptide a concentrazioni pari allo 0.02 M in acqua è parzialmente protonato, mentre in buffer è totalmente deprotonato. Quindi il tampone è in parte responsabile del confinamento degli ioni all'interfase e della loro estrusione dai dendrimeri e dai peptidi, sia a causa di un "salt" effect che varia la ionicità superficiale delle molecole in soluzione e comprime l'interfase, sia per una logica competizione tra gli ioni del buffer e gli ioni rame per interagire con le molecole in soluzione.
- Occorre infine sottolineare che gli spettri a T ambiente mostrano condizioni di mobilità molto bassa (se si esclude il complesso Cu-O4), che è simile a quella riscontrata a bassa temperatura. Questo indica che già a T ambiente gli ioni interagenti con il dendrimero e/o il peptide sono bloccati in interazioni forti, anche in correlazione con la struttura poco flessibile del dendrimero.

*Seconda linea di ricerca: Dendrimeri fosforilati con funzionalità chemioterapiche e complessati con Cu(II) per la cura del cancro*

Dendrimeri fosforilati sono stati appositamente funzionalizzati ai siti esterni con i gruppi attivi di farmaci chemioterapici la cui attività antitumorale ha mostrato di essere incentivata per formazione di complessi con ioni Cu(II).

Abbiamo quindi studiato struttura e proprietà dinamiche dei complessi che si formano all'interno dei sistemi:

- *Sistema Cu(II)+dendrimeri,*

- *Sistema* Cu(II)+dendrimer+linea cellulare tumorale e non.

Si è proceduto con il monitorare l'evoluzione dei processi di complessazione tra particolari fosfodendrimeri a seguito dell'interazione con il nitrato di rame in soluzione di DMF e tampone; stabilita la struttura e la stabilità dei complessi ottenuti, si è proceduto poi nella valutazione delle peculiari proprietà antitumorali dei complessi Cu-dendrimeri nei confronti di cellule tumorali e non.

Tutti gli spettri sono stati eseguiti nelle stesse condizioni strumentali per consentire un confronto dell'intensità assoluta tra i diversi campioni.

L'analisi dei campioni è stata condotta sia a temperatura ambiente (298K) che a bassa temperatura (150K) ottenuta utilizzando azoto liquido.

In prima istanza, come già visto per la prima linea di ricerca, lo spettro ottenuto dall'analisi a temperatura ambiente fornisce, per mezzo della simulazione della forma di riga, non solo i parametri magnetici che simulano anche lo spettro a bassa temperatura e permettono di identificare struttura e geometria del complesso, ma anche un parametro dinamico che dà informazioni sulla flessibilità della struttura. Si ottengono quindi informazioni sulla struttura chimica, la flessibilità e stabilità di questi complessi in relazione alla natura dei ligandi, la dimensione dei dendrimeri e il rapporto molare tra Cu(II) e i ligandi.

I parametri principali usati quindi per il confronto degli spettri del Cu(II) a temperatura ambiente e bassa temperatura sono stati:

- La componente  $g_{ii}$  per l'accoppiamento tra lo spin dell'elettrone e il campo magnetico;
- La componente  $A_{ii}$  per l'accoppiamento tra lo spin dell'elettrone e lo spin nucleare del rame ( $I_{Cu} = 3/2$ );
- Il tempo di correlazione per il moto rotazionale di diffusione degli ioni Cu(II) complessati;
- $W_{ii}$  che misura la larghezza delle righe  $x$ ,  $y$  e  $z$ ;

I parametri magnetici,  $g_{ii}$  e  $A_{ii}$  sono stati direttamente misurati nello spettro a bassa temperatura mediante calibrazione con il radicale DPPH e poi ottimizzati tramite la simulazione degli spettri.

I parametri ottenuti per tutti gli spettri sono caratteristici di una coordinazione planare quadrata o eventualmente di una coordinazione ottaedrica distorta, con l'orbitale  $d_{x^2-y^2}$  come stato fondamentale.

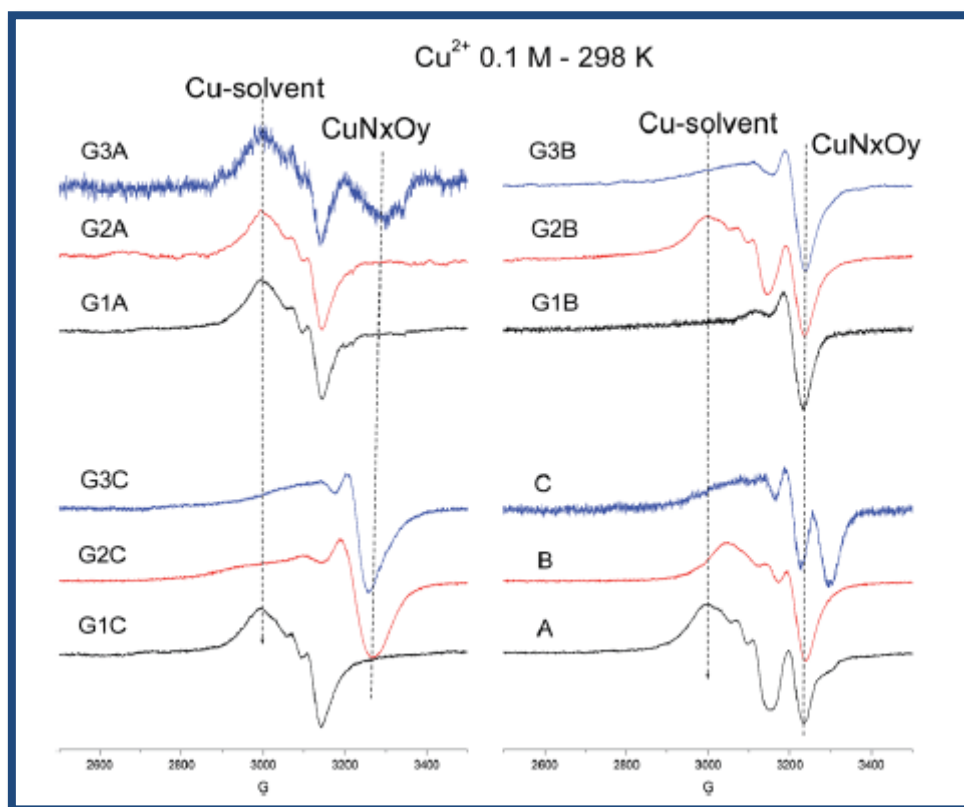
In questo caso, una diminuzione del  $g_{zz}$  e un aumento di  $A_{zz}$  individuano un aumento di siti azotati nella sfera di coordinazione del Cu(II) e/o una maggiore forza di interazione

In molti casi, gli spettri erano costituiti da due o tre componenti in base alle diverse modalità di coordinazione e alla geometria dei complessi Cu(II)-dendrimeri.

La sottrazione tra gli spettri in diverse condizioni sperimentali permette l'estrazione delle componenti spettrali che costituiscono gli spettri EPR globali, inoltre permette di calcolare, mediante doppia integrazione di ogni componente, le percentuali relative dei componenti, con una precisione di  $\pm 1\%$ .

#### *Complesso Cu-dendrimeri e monomeri in assenza di cellule:*

La figura sottostante mostra gli spettri EPR a temperatura ambiente della soluzione 0.1 M di Cu(II) in DMF che contiene sia i dendrimeri che i monomeri di natura chemioterapica utilizzati per funzionalizzare la superficie esterna del dendrimeri alla concentrazione di 0.1 M. Tali monomeri sono stati indicati con le lettere A, B, e C e mostrati in Figura 42 del precedente capitolo.



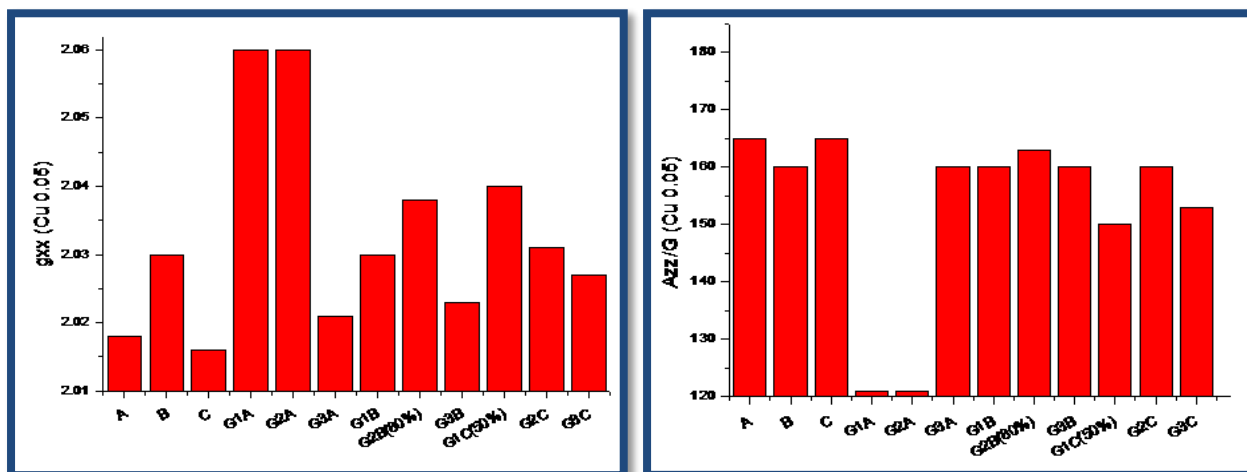
Le righe tratteggiate verticali individuano i picchi principali di differenti segnali corrispondenti a diversi siti di coordinazione e diverse geometrie ottenute a seguito dell'interazione degli ioni rame alla stessa concentrazione interagente sia con i dendrimeri che con i monomeri.

Dalle simulazioni degli spettri ottenuti a 298 K e a 150 K è stato possibile valutare i parametri magnetici. La Tabella 3 riporta i dati ottenuti dalle simulazioni spettrali relativi ai parametri  $g_{ii}$ ,  $A_{zz}$ , per i quali, come detto sopra, una diminuzione del  $g_{zz}$ , ma anche del  $g_{xx}$ , e un aumento di  $A_{zz}$  individuano un aumento di siti azotati nella sfera di coordinazione del Cu(II) e/o una maggiore forza di interazione.

Cu <sup>2+</sup> (M)	%	$\bar{g}_{xx}$	$\bar{g}_{yy}$	$\bar{g}_{zz}$	$A_{\pi}$ (G)	$\tau$ (ns)	Coord.
<b>A</b>							
0.01	100	2.003	2.075	2.208	195	0.08	CuN <sub>4</sub>
0.05	100	2.018	2.05	2.23	165	0.08	CuN <sub>4</sub>
0.1	60	2.038	2.04	2.3	150	0.08	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	40	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
0.3	18	2.038	2.04	2.3	150	0.08	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	82	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
0.5	7	2.038	2.04	2.3	150	0.08	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	93	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>B</b>							
0.01	100	2.03	2.064	2.256	160	0.07	CuN <sub>4</sub> -CuN <sub>2</sub> O
0.03	100	2.03	2.064	2.256	160	0.07	CuN <sub>4</sub> -CuN <sub>2</sub> O
0.1	85	2.031	2.065	2.26	155	0.07	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	15	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
0.3	30	2.031	2.065	2.26	155	0.07	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	70	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>C</b>							
0.01	100	2.016	2.052	2.233	165	0.3	CuN <sub>4</sub>
0.03	100	2.016	2.052	2.233	165	0.3	CuN <sub>4</sub>
0.05	100	2.016	2.052	2.233	165	0.3	CuN <sub>4</sub>
0.1	35	2.04	2.04	2.3	150	0.12	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	65	2.006	2.048	2.221	178	0.4	CuN <sub>4</sub>
0.3	25	2.04	2.04	2.3	150	0.12	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	75	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
0.5	10	2.04	2.04	2.3	150	0.12	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	90	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>G1A</b>							
0.01	100	—	—	—	—	—	
0.05	100	—	—	—	—	—	
0.1	100	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>G2A</b>							
0.01	100	2.008	2.05	2.22	170	3.3	CuN <sub>4</sub>
0.03	15	2.008	2.05	2.22	170	3.3	CuN <sub>4</sub>
—	85	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
0.05	100	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
0.1	100	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>G3A</b>							
0.01	100	2.021	2.06	2.255	160	7	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.03	100	2.021	2.06	2.255	160	7	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.1	50	2.032	2.07	2.272	145	4	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -CuNO <sub>3</sub>
—	50	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
0.3	100	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>G1B</b>							
0.01	100	2.03	2.064	2.256	160	1	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.03	100	2.03	2.064	2.256	160	0.4	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.05	100	2.03	2.064	2.256	160	0.2	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Cu <sup>2+</sup> (M)	%	$\bar{g}_{xx}$	$\bar{g}_{yy}$	$\bar{g}_{zz}$	$A_{\pi}$ (G)	$\tau$ (ns)	Coord.
<b>0.1</b>							
	60	2.038	2.076	2.29	151	0.35	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	40	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>G2B</b>							
0.01							
0.03	100	2.038	2.05	2.288	163	0.33	CuN <sub>4</sub> -CuN <sub>2</sub> O
0.05	20	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
—	80	2.038	2.05	2.288	163	0.33	CuN <sub>4</sub> -CuN <sub>2</sub> O
0.1	65	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
—	35	2.038	2.05	2.288	163	0.33	CuN <sub>4</sub> -CuN <sub>2</sub> O
0.3	95	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
—	5	2.038	2.05	2.288	163	0.33	CuN <sub>4</sub> -CuN <sub>2</sub> O
0.5	100	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>G3B</b>							
0.01	100	2.021	2.06	2.253	168	8	Cu-N <sub>4</sub>
0.03	100	2.021	2.06	2.255	160	7	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.05	100	2.023	2.06	2.255	160	6	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.1	100	2.04	2.048	2.298	152.5	0.23	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.3	25	2.04	2.048	2.298	152.5	0.23	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	75	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
0.5	100	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>G1C</b>							
0.01	100	2.018	2.05	2.23	165	2	CuN <sub>4</sub> -CuN <sub>2</sub> O
0.03	100	2.03	2.04	2.28	150	4	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.05	50	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
—	50	2.04	2.04	2.3	150	0.17	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.1	100	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>G2C</b>							
0.01	100	2.031	2.064	2.255	160	0.2	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.05	100	2.031	2.064	2.255	160	0.2	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.1	50	2.031	2.064	2.255	160	0.2	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	50	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
<b>G3C</b>							
0.01							
0.05	100	2.023	2.06	2.255	160	6	CuN <sub>2</sub> O-CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.1	90	2.027	2.082	2.265	153	0.35	CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
—	10	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv
0.3	100	2.06	2.07	2.385	121	0.05	Cu-solv

Confrontando i diversi parametri ottenuti, si è proceduto alla realizzazione di diversi istogrammi, dai quali si evincono le diverse proprietà che caratterizzano i differenti sistemi posti in esame.

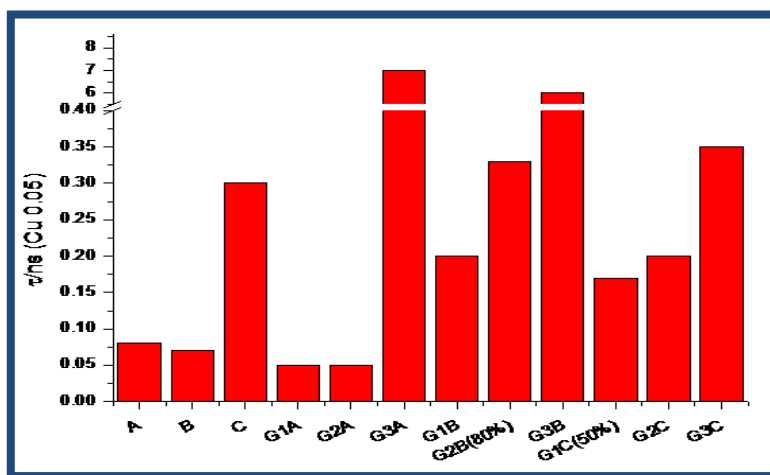


Analizzando gli istogrammi si osserva che:

- I dendrimeri G1A e G2A rispetto al monomero A presentano un aumento significativo dei parametri  $g_{ii}$ , mentre  $A_{zz}$  tende a diminuire. Tale andamento è sinonimo della perdita dei siti azotati di legame da parte del Cu(II) a causa della struttura ingombrante e rigida dei dendrimeri.
- Il monomero B è caratterizzato da valori di  $g_{ii}$  maggiore e un valore di  $A_{zz}$  minore rispetto a quelli del monomero A. Pertanto B lega debolmente gli ioni Cu(II). Tale situazione si mantiene per G1B, mentre il dendrimero G2B assume un comportamento differente, infatti ad una concentrazione di rame pari allo 0.05 M presenta una frazione di ioni libera pari al 20% mentre il restante 80% è caratterizzata da ioni interagenti.
- Il monomero C mostra una maggiore stabilità della coordinazione Cu-N4. Il dendrimero G1C invece è caratterizzato da un 50% di ioni interagenti legati al dendrimero con valori molto bassi di  $A_{zz}$ . In generale la coordinazione con i siti azotati aumenta in stabilità, in un range maggiore di concentrazioni di rame, con l'aumentare della generazione. Infatti i dendrimeri di generazione 3 presentano un abbassamento dei valori  $g_{ii}$  e un aumento dei valori di  $A_{zz}$ , tutto ciò indica la coordinazione con i siti azotati presenti sul polimero.

Si è proceduto poi con lo studio dei valori relativi al parametro  $\tau$ , parametro che indica la forza di interazione che si stabilisce tra gli ioni e i siti di legame, influenzato dalla dimensioni dei ligandi e dalla flessibilità dei rami del dendrimero.

Dall'istogramma si osserva che :



- Il monomero C ha un valore di  $\tau$  elevato in quanto lega più fortemente gli ioni.
- Per i dendrimeri G1C e G2C il legame con gli ioni è debole e questo porta alla formazione di complessi molto mobili, situazione identica per il monomero A. In questi casi sembra quasi che gli ioni non riescano a coordinarsi sui siti azotati ma che tendano a formare dei ponti lungo le ramificazioni del dendrimero.
- La serie B al contrario, grazie alla sua elevata struttura flessibile permette una perfetta coordinazione dei siti azotati presenti sulla sua superficie, caratterizzati da una notevole forza di legame.

Dalle analisi spettrali, includendo le informazioni relative alle variazioni di intensità spettrale, è possibile quindi affermare che:

Serie A. Alla più bassa concentrazione di Cu (0.01 M), il monomero A e il dendrimero di generazione 1 (G1A) forniscono un segnale a bassissima intensità, mentre quelli di generazione maggiore (G2A e

G3A) hanno un'intensità simile a quella dei bianchi. Tale risultato permette di stabilire che gli ioni funzionano come ponti tra i monomeri e tra le molecole dendrimeriche a generazione 1. La perdita di intensità è dovuta al fatto che questi dendrimeri sono poco flessibili, come indica il valore corrispondente di  $\tau$ , e quindi gli ioni vengono intrappolati all'interno del polimero occupando siti vicini, tale vicinanza fa sì che questi siano soggetti ad interazioni spin-spin che provocano la riduzione dell'intensità spettrale.

A concentrazioni maggiori, il monomero A è caratterizzato da un progressivo aumento di intensità associata alla variazione della coordinazione del rame da:  $\text{CuN}_4$  tra 0.01 M e 0.05 M, a  $\text{CuN}_3\text{O}$  tra 0.05 M e 0.07 M, e a  $\text{CuN}_2\text{O}_2$  tra 0.07 M e 0.1 M.

Alle più alte concentrazioni di rame la coordinazione  $\text{CuN}_2\text{O}_2$  risulta essere solo del 7 % e la maggior parte degli ioni è interagente con il solvente.

I dendrimeri della serie A si comportano in modo del tutto differente l'uno dall'altro:

- G1A non dà segnale EPR fino alla concentrazione 0.1 M di  $\text{Cu(II)}$ , cioè fino ad un rapporto molare 1:1 tra gli ioni e i gruppi funzionali del dendrimero, indicando la formazione di interazioni a ponte, in cui gli ioni si inseriscono tra dendrimeri diversi. Per il monomero A l'intensità è molto bassa, ma il segnale del complesso  $\text{Cu-N}_4$  è visibile;
- per G2A il segnale diventa visibile in quanto è favorita la coordinazione interna  $\text{CuN}_4$  che si identifica già ad una concentrazione di rame pari a 0.03 M,
- G3A mostra una ridotta coordinazione di siti azotati a basse concentrazioni di rame poiché la maggiore dimensione rende meno flessibile la struttura e i gruppi azotati superficiali diventano meno disponibili.

Serie B. La suddetta serie invece è caratterizzata da una notevole flessibilità dei gruppi esterni rispetto alla serie A, proprietà che permette agli ioni di coordinare siti vicini del dendrimero senza



risentire l'uno dell'altro, e quindi senza la conseguente riduzione di intensità spettrale.

È il dendrimero di generazione 3 (G3B) che tra tutti dà la maggiore intensità spettrale dovuta sia all'omogenea distribuzione dei siti interagenti che permetto agli ioni rame di interagire ma anche grazie al minor ingombro sterico delle ramificazioni.

Serie C. Il dendrimero G1C mostra una coordinazione CuN<sub>4</sub>-CuN<sub>3</sub>O simile a quella del monomero C alla concentrazione 0.01 M di rame. Sembra che gli ioni siano in grado di formare complessi chelati all'interno dello stesso dendrimero. Aumentando la concentrazione del rame si ottiene la coordinazione CuN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che sostituisce quella CuN<sub>4</sub> distorta, in questo caso però a causa della vicinanza tra gli ioni interagenti si osserva una riduzione dell'intensità.

In G3C le ramificazioni sono ravvicinate impedendo agli ioni di coordinare i siti azotati superficiali già a concentrazioni base di rame. A concentrazioni pari 0.1 M si ha la formazione del complesso CuN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che fornisce un segnale EPR.

#### *Complesso Cu-dendrimero e monomeri in presenza di cellule:*

In questa seconda fase sperimentale, si è voluto testare la capacità del dendrimero G3B, che l'analisi EPR preliminare ha individuato come quello che forma complessi più stabili con gli ioni Cu(II), di interagire preferenzialmente con le cellule tumorali, accentuando le capacità antitumorali del dendrimero in questione. Si è scelto di operare con una concentrazione di Cu(II) pari allo 0.05 M così da garantire una coordinazione CuN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> senza avere una totale saturazione dei siti di coordinazione.

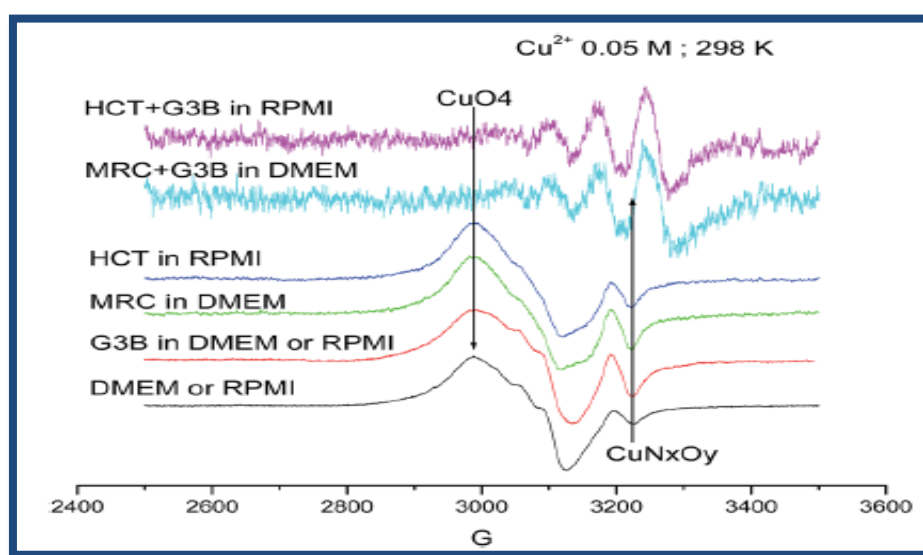
L'utilizzo di cellule negli esperimenti deve prevedere sempre un mezzo di coltura che ne assicuri la stabilità vitale, per questo la linea cellulare MRC-5 è stata coltivata in DMEM mentre le cellule HCT-116 in RPMI.

Il primo passo nello studio dell'interazione dei dendrimeri con le due linee cellulari è stato quello di analizzare differenti sistemi interagenti, come:

- Sistema Cu(II) in DMEM e in RPMI,
- Sistema Cu(II)+G3B,
- Sistema Cu(II)+CELLULE MRC-5 e HCT-116,
- Sistema Cu(II)+CELLULE MRC-5 e HCT-116, +G3B.

Prima dello studio allo spettrometro EPR, la vitalità cellulare è stata valutata con il test di esclusione del Trypan Blue. Anche se la morte cellulare non può essere valutata via EPR, la variazione delle caratteristiche spettrali fornisce informazioni sui differenti siti di interazione e la proliferazione cellulare.

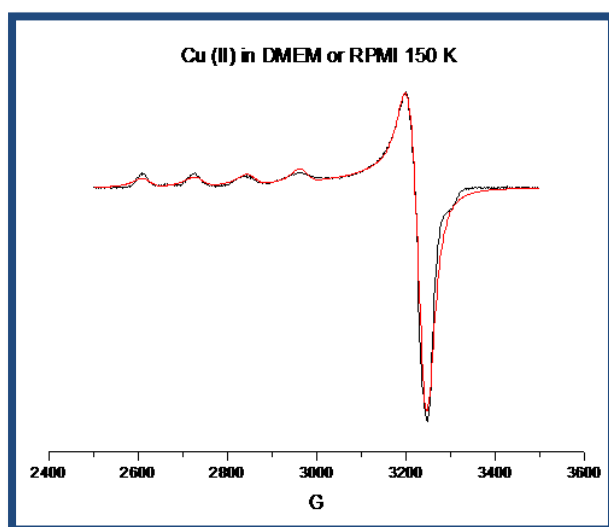
La figura qui di seguito mostra lo spettro EPR a 298K per i differenti sistemi sopra citati.



Dall'analisi spettrali sono state dedotte le seguenti informazioni:

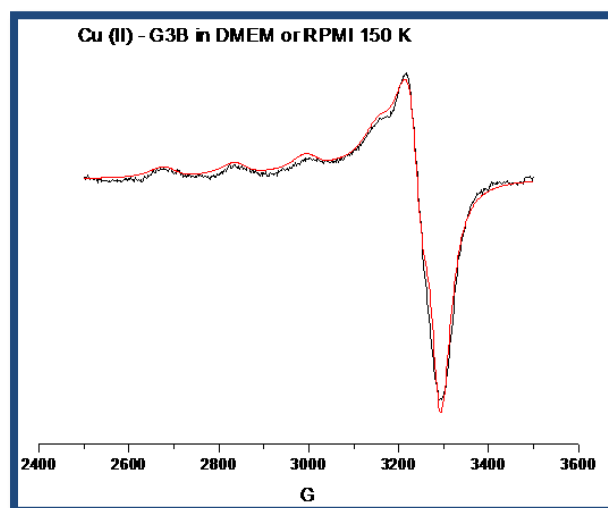
- *Sistema Cu(II) in DMEM e in RPMI:*  
lo spettro del Cu(II) in DMEM e RPMI presenta una componente pari al 10% relativa a una coordinazione CuO<sub>3</sub>N. Quindi lo spettro differisce da quello relativo al rame

solubilizzato in DMF. Le componenti dei terreni interferiscono con il Cu(II) impedendo la sua coordinazione con i siti azotati. Tuttavia si riscontra una forte coordinazione tra Cu(II) e i siti di ossigeno del mezzo di crescita.



- *Sistema Cu(II)+G3B:*

Aggiungendo G3B alla soluzione di Cu(II) in DMEM e RPMI, solo il 35% degli ioni Cu risulta coinvolto nella coordinazione  $\text{CuN}_3\text{O}-\text{CuN}_2\text{O}_2$  con i gruppi esterni funzionali del dendrimero, mentre il restante 65% viene escluso dal dendrimero e implica una coordinazione  $\text{CuO}_4$  nel mezzo di soluzione. Questo significa che i mezzi di coltura (DMEM e RPMI) contengono specie che interagiscono con i siti azotati presenti sul G3B inducendo una saturazione precoce di questi siti nella coordinazione con Cu(II).

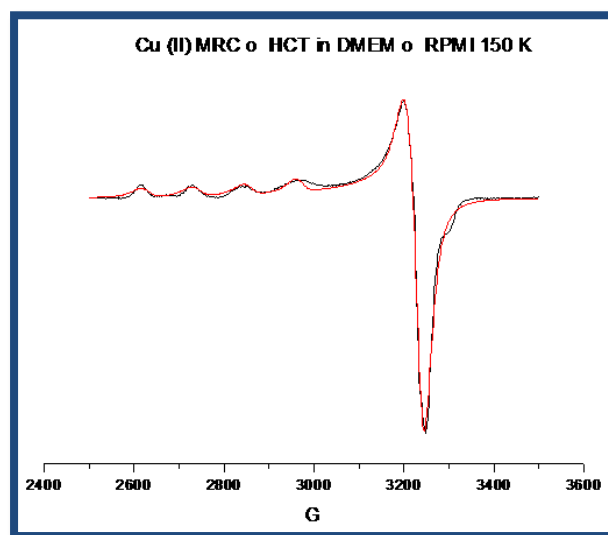


- *Sistema Cu(II)+CELLULE:*

Diverso è il comportamento di Cu(II) nelle colture cellulari in assenza dei dendrimeri. In questo caso si nota la formazione di una coordinazione  $\text{CuN}_2\text{O}_2$ . Inoltre la coordinazione  $\text{CuO}_4$  nel caso di Cu(II)+cellule presenta valori di  $A_{zz}$  ridotto e  $g_{zz}$  aumentato, indice di una forte interazione tra il Cu e i siti ossigenati delle cellule.

Per quanto riguarda le cellule è importante dire che le relative percentuali di  $\text{CuN}_2\text{O}_2$  e della nuova componente  $\text{CuO}_4$  cambiano nelle soluzioni di MRC e HCT. Infatti con MRC la componente  $\text{CuN}_2\text{O}_2$  è del 32% mentre con HCT è del 20%.

Tutto ciò indica che il Cu(II) interagisce preferenzialmente con i siti ossigenati delle cellule tumorali rispetto a quelle sane.



- *Sistema Cu(II)+CELLULE+G3B:*

Dall'analisi del sistema ternario si è scoperto che una frazione di ioni conserva lo spettro di Cu+G3B se le cellule vengono aggiunte alla fine e, similmente, lo spettro di Cu+cellule è mantenuto se il dendrimero è aggiunto per ultimo.

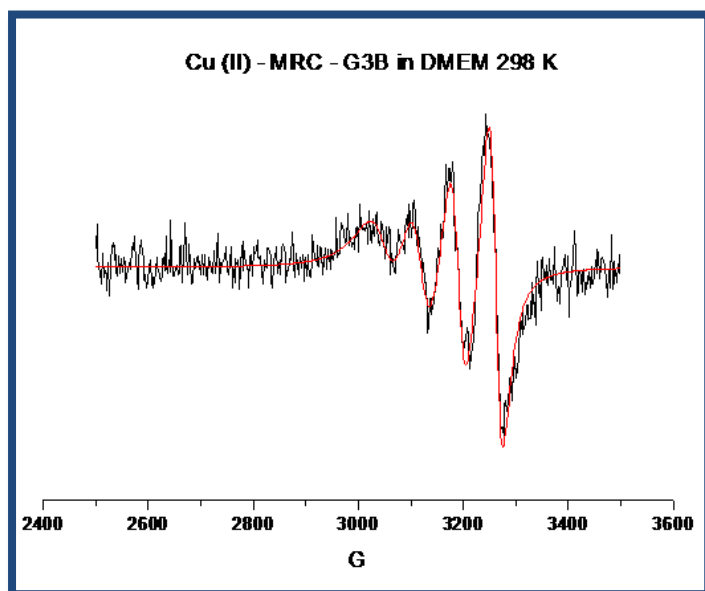
Il discorso cambia se sono gli ioni ad essere aggiunti dopo; gli spettri, in questo caso mostrano una singola componente caratteristica della coordinazione  $\text{CuN}_4$ .

Nonostante ciò, l'interazione dendrimero-cellula coinvolge particolarmente i siti di ossigeno, che quindi non sono più disponibili all'interazione con il Cu(II), ma va a modificare la struttura del dendrimero favorendo la coordinazione del Cu(II) con 4 siti azotati in una condizione fluida. In questo caso lo spettro ha una minore intensità.

Ciò significa che i siti di ossigeno sono impegnati nelle interazioni dendrimero-cellule che originano strutture supramolecolari dove gli ioni Cu sono concentrati o separati dalla soluzione e quindi non sono visibili negli spettri.

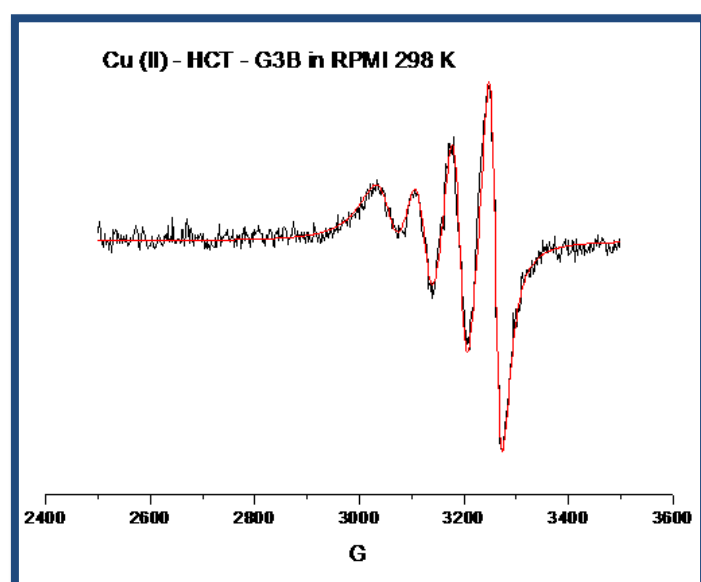
D'altro canto la coordinazione  $\text{CuN}_4$  diviene più probabile proprio perché nelle strutture supramolecolari i siti azotati sono più disponibili e quindi capaci di ospitare gli ioni Cu(II). Sulla base dei dati EPR, gli ioni complessati hanno un'alta mobilità rotazionale.

Ulteriori informazioni derivano dall'effetto dei diversi tempi di equilibratura nelle cellule che contengono i campioni. Lo spettro del sistema ternario caratterizzato dalle cellule HCT aumenta di intensità dopo 24h e dopo 72h, invece, diminuisce del 20%.



Questa riduzione in intensità è correlata alla produzione di radicali che di solito promuovono la crescita della cellula cancerogena e indicano un'inibizione dell'80 % della proliferazione cellulare.

Per quanto riguarda lo spettro con MRC accade il contrario, ovvero l'intensità diminuisce dopo 24 ore di equilibratura ma raggiunge il massimo dopo 48h, e appare la componente  $\text{CuO}_4$  che sta a indicare che gli ioni sono in parte isolati dai siti di legame e tornano indietro ai siti ossigenati delle cellule.



Importanti sono anche le differenze spettrali presenti tra il sistema  $\text{Cu(II)} + \text{MRC} + \text{G3B}$  e  $\text{Cu(II)} + \text{HCT} + \text{G3B}$ , il primo sistema ternario presenta una minore intensità rispetto all'altro. Questa riduzione di intensità è causata dagli ioni Cu che, essendo concentrati in uno spazio confinato a causa delle interazioni dendrimero-cellula, sono coinvolti in interazioni spin-spin. In linea con questo, il legame tra il Cu e i siti azotati è più forte e la mobilità è più lenta nei campioni contenenti MRC rispetto a quelli con HCT, poiché gli ioni sono costretti ad avvicinarsi ai siti azotati nella soluzione di  $\text{G3B} + \text{MRC}$ . Nel sistema ternario con HCT la proliferazione cellulare viene bloccata dai dendrimero complessato con  $\text{Cu(II)}$  che quindi è distribuito all'interfase e le interazioni spin-spin diminuiscono.

*Terza linea di ricerca: Caratterizzazione di nuovi farmaci prodotti dalla ditta Telormedix (Manno-Ch) stimolatori del TLR7 in presenza e assenza di cellule in grado di esprimere tale recettore.*

Questo studio si propone di contribuire alla ricerca pre-clinica della ditta Telormedix focalizzata sul TLR7 con l'obiettivo chiave di produrre farmaci immuno-modulatori per il trattamento del cancro e delle malattie infiammatorie. Il TLR7 è espresso nell' endosoma della cellula.

Due colture cellulari sono state usate per verificare permeazione-penetrazione e interazioni nei liquidi intracellulari, interfasale extracellulari, senza e con l'espressione di TLR7: cellule HEK293 che non esprimono (HEK-Blue <sup>TM</sup> Null1-k) e che esprimono il TLR7 (HEK-Blue <sup>TM</sup> -hTLR7), prodotte da Invivogen. Le due linee cellulari sono state chiamate, per semplicità, Null e HTLR7 rispettivamente. Le Null sono state utilizzate come riferimento. Le due linee cellulari necessitano anche di antibiotici specifici che sono stati utilizzati per preservare le cellule e favorire la stimolazione per produrre TLR7. Entrambe le linee cellulari hanno come mezzo il DMEM con aggiunta di Zeocina e Normocina come antibiotici specifici, ma le cellule HTLR7 hanno bisogno anche di Blasticidina. Per questo motivo i due supporti diversi sono stati chiamati ZN e BZN rispettivamente.

I farmaci selezionati – fosfolipidi- e PEG- coniugati del farmaco 1V209, denominati TMX-n, dove n differenzia le varie coniugazioni - appartengono alla classe dei cosiddetti modulatori dei Toll-like receptors (TLR), e sono stati sviluppati da Telormedix. Per caratterizzare le interazioni che avvengono tra i farmaci e le cellule e la variazione della organizzazione cellulare a causa dell'aggiunta dei farmaci, sono stati eseguiti e discussi nel presente studio esperimenti di risonanza paramagnetica elettronica (EPR) utilizzando sonde di



spin selezionate sulla base di studi precedenti che hanno già rivelato essere uno strumento utile per caratterizzare la struttura, le interazioni e le proprietà dinamiche delle biomolecole in soluzione. Sulla base di questi studi precedenti, abbiamo scelto le sonde di spin indicate come 5DSA, CAT8 e CAT16. Queste sonde di spin sono poco perturbative e in ogni caso mimano il comportamento di molecole biologiche e mostrano affinità con porzioni dei vari farmaci

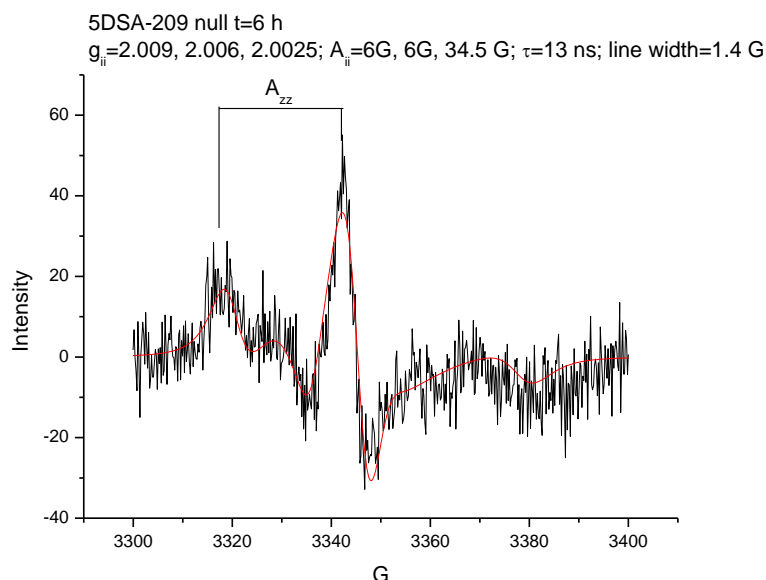
I risultati ottenuti verranno ora analizzati e discussi per ciascuna sonda e poi riassunte le principali informazioni.

Occorre prima di tutto sottolineare il fatto che gli spettri dei radicali nel medium, in assenza e presenza dei farmaci, non subiscono variazioni sostanziali sia tra un farmaco ed un altro, sia in funzione del tempo. E' solo in presenza delle cellule che si riscontrano effetti e variazioni spettrali interessanti che sono quindi imputabili alle interazioni che hanno luogo tra cellule e farmaco dove il radicale partecipa come sonda per fornire informazioni sulle proprietà chimico fisiche del sistema in esame.

## **5DSA**

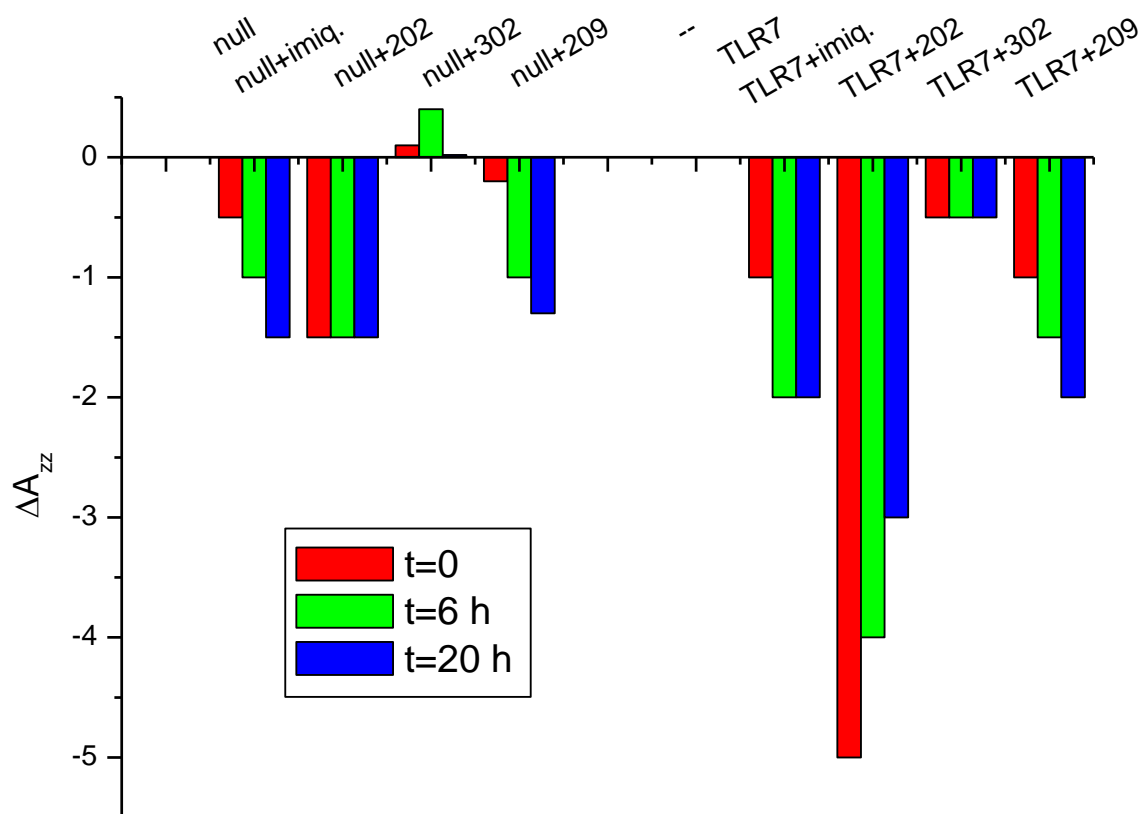
- La sonda è idrofoba e insolubile in acqua o nel medium in assenza di cellule (nessun segnale EPR)
- In presenza delle cellule la sonda si solubilizza, anche se a bassa intensità EPR
- E' stato verificato che, nelle concentrazioni utilizzate (0.5 mM) e nei tempi di analisi (fino a 20 h), la sonda non mostra citotossicità e non si riscontra morte cellulare indotta
- Lo spettro EPR della sonda nelle cellule null in presenza di 209 è tra i più intensi ed è mostrato nella seguente figura, insieme alla

simulazione ottenuta con opportuno programma di calcolo (NLSL by Budil&Freed) che permette di ottenere informazioni sulla struttura e proprietà dell'intorno molecolare:



Lo spettro è caratteristico di una struttura a bassa fluidità, quindi la sonda si trova intrappolata e interagente con i fosfolipidi costituenti la membrana in un intorno a medio-bassa polarità come quello atteso all'interno della membrana ma in vicinanza della sua superficie (il gruppo radicalico si trova in posizione 5 della catena stearica, quindi in vicinanza della superficie della membrana).

Il parametro  $A_{zz}$  misura microviscosità/polarità dell'intorno molecolare e viene riportata la sua variazione ( $\Delta A_{zz}$ ) per aggiunta dei diversi farmaci per le null e le TLR7 nella seguente figura:

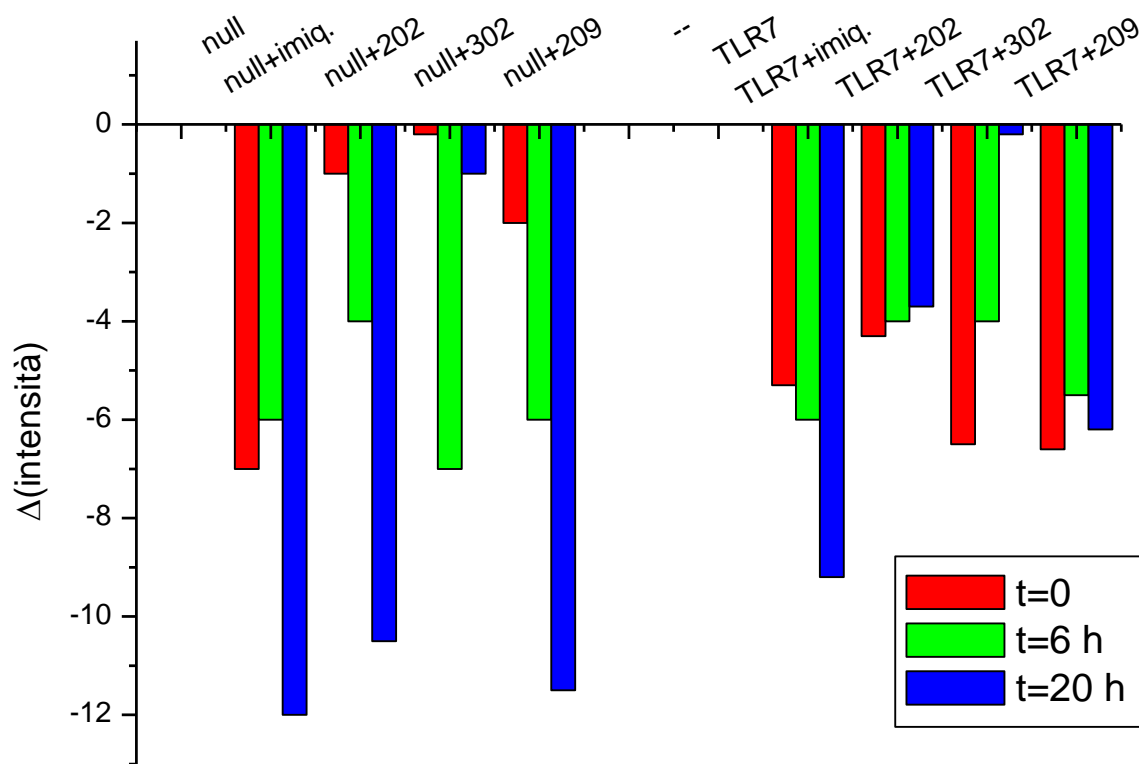


Questi risultati sembrano molto interessanti e sono interpretabili come segue:

- Non si ha sostanziale variazione tra le null e le TLR7 in assenza dei farmaci, quindi l'intorno molecolare varia poco nei due casi
- In presenza di imiquimod il parametro diminuisce, quindi l'imiquimod si inserisce in membrana e fa diminuire la microviscosità/polarità dell'intorno della sonda. L'effetto è significativamente più consistente per le TLR7 che per le null.
- L'effetto descritto per l'imiquimod è assai maggiore per il 202, soprattutto nel caso delle cellule TLR7.

- Per aggiunta di 302, nel caso delle null, il parametro aumenta, anche se di poco, quindi la microviscosità/polarità aumenta, cioè aumentano le interazioni tra molecole nell'intorno della sonda. Al contrario, si ha ancora una piccola diminuzione del parametro per le cellule TLR7 che quindi vengono strutturalmente perturbate, anche se in modo blando, dal 302
- L'effetto del 209 somiglia a quello dell'imiquimod per le null, ma la perturbazione nelle TLR7 è minore, probabilmente a causa della maggiore polarità del farmaco che quindi è meno penetrante nella struttura cellulare.

Ulteriori informazioni si ottengono analizzando le variazioni di intensità del segnale EPR ( $\Delta(\text{intensità})$ ) conseguenti all'aggiunta dei farmaci:



L'analisi di questo istogramma fornisce le seguenti informazioni:

- Le null e le HTLR in assenza di farmaci mostrano equivalenti intensità ai tre tempi analizzati.
- si ha, per tutti i campioni, una diminuzione di intensità per aggiunta dei farmaci. Questa diminuzione può essere correlata a diversi effetti: (a) il farmaco facilita l'avvicinamento di antiossidanti al sito radicalico, cioè in membrana, (b) il farmaco interagisce con la membrana diminuendo la solubilizzazione del radicale all'interno di essa, (c) il farmaco interagisce con la sonda e la trascina in zona esposta. La contemporanea diminuzione del parametro Azz indica una variazione dell'intorno radicalico cioè i farmaci generano un intorno più fluido.
- Per le null, la diminuzione a  $t=0$  è maggiore con imiq, seguita da 209, mentre l'effetto di 202 e ancor più di 302 è piccolo
- Per le null, a  $t=6$  h la diminuzione per 209 diventa equivalente a quella con imiq e aumentano in modo significativo anche gli effetti di 202 e, soprattutto, di 302. Per quest'ultimo farmaco a  $t=6$  h l'effetto perturbativo sull'intensità è massimo, ma di poco superiore a quello di imiq e 209
- Infatti, a  $t=20$  h, l'intensità in presenza del farmaco 302 torna ad aumentare. Questo farebbe pensare ad un interazione farmaco-sonda che permane dopo che le cellule si sono degradate oppure ad un effetto protettivo del farmaco sulla struttura cellulare dove la sonda è localizzata
- Al contrario, per le null a  $t=20$  h, tutti gli altri farmaci mostrano una significativa diminuzione di intensità del segnale EPR che, vista la variazione contenuta del parametro Azz, è maggiormente da correlarsi con la degradazione cellulare che provoca

l'estromissione del radicale nel liquido extramembrana dove la sua solubilità è bassa

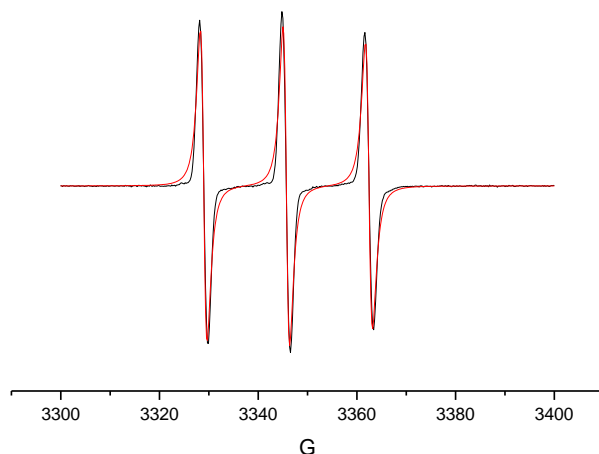
- Per le cellule TLR7 a  $t=0$  la diminuzione di intensità è sensibile per tutti i farmaci (solo poco meno per 202), mentre a  $t=6$  h le variazioni di intensità non sono così diverse tra null e TLR7 (il farmaco 302 dà una diminuzione minore, sempre correlabile alle interazioni farmaco-sonda)
- E' interessante notare che la diminuzione di intensità da  $t=6$  h a  $t=20$  h per le cellule TLR7 è minore che per le null. Quindi, se tale diminuzione è correlata alla degradazione cellulare, si evince che tale degradazione è minore per le TLR7. Per 302 comunque la variazione di intensità diventa quasi trascurabile a  $t=20$  h, probabilmente ancora a causa delle interazioni sonda-farmaco o di un qualche effetto protettivo generato dal suddetto farmaco alla struttura cellulare

## CAT8

Questa sonda è invece solubile in acqua, ma è caratterizzata da una parte idrofila e carica positivamente (con contraione Bromuro) ed una parte idrofoba (una catena di 8 atomi di carbonio). Abbiamo già verificato che questa sonda si presta particolarmente bene per studiare bio-interfasi, cioè le interazioni che hanno luogo alla superficie di una proteina o una membrana. Anche in questo caso è stato verificato che, nelle concentrazioni utilizzate (0.5 mM) e nei tempi di analisi (fino a 20 h), la sonda non mostra citotossicità e non si riscontra morte cellulare indotta.

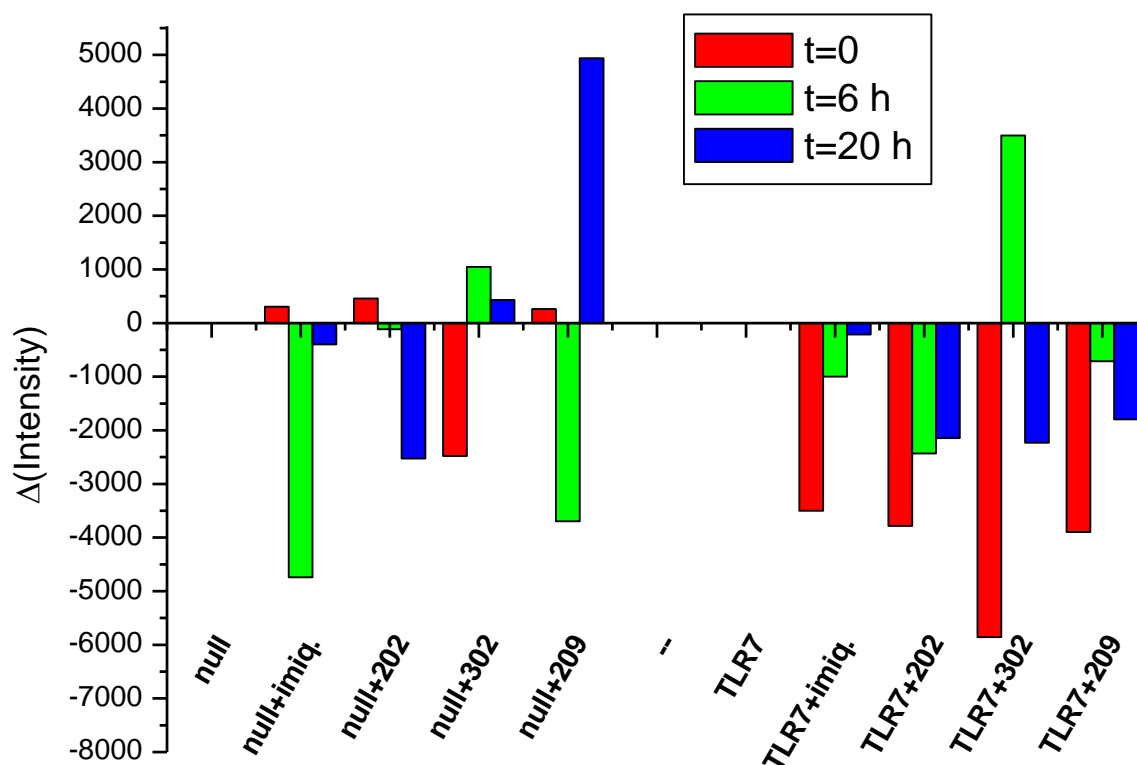
La figura seguente mostra uno spettro simulato dal quale abbiamo ottenuto parametri caratteristici di polarità ( $A_{zz}$ ) e microviscosità ( $\square$ ), oltre all'intensità spettrale:

CAT8-202 HTLR t=6 h  
 $g_{\parallel}=2.009, 2.006, 2.0035$ ;  $A_{\parallel}=6\text{G}, 6\text{G}, 38.23\text{ G}$ ;  $\tau=0.038\text{ ns}$ ; line width=1.1 G



Anche in questo caso abbiamo valutato le variazioni dei parametri che individuano le variazioni dell'intorno della sonda. Nel grafico seguente sono mostrate le variazioni di intensità degli spettri EPR per aggiunta dei farmaci alle cellule null e TLR7:

CAT8: variazione di intensità per aggiunta farmaci



Le informazioni che si ottengono sono riassunte come segue:

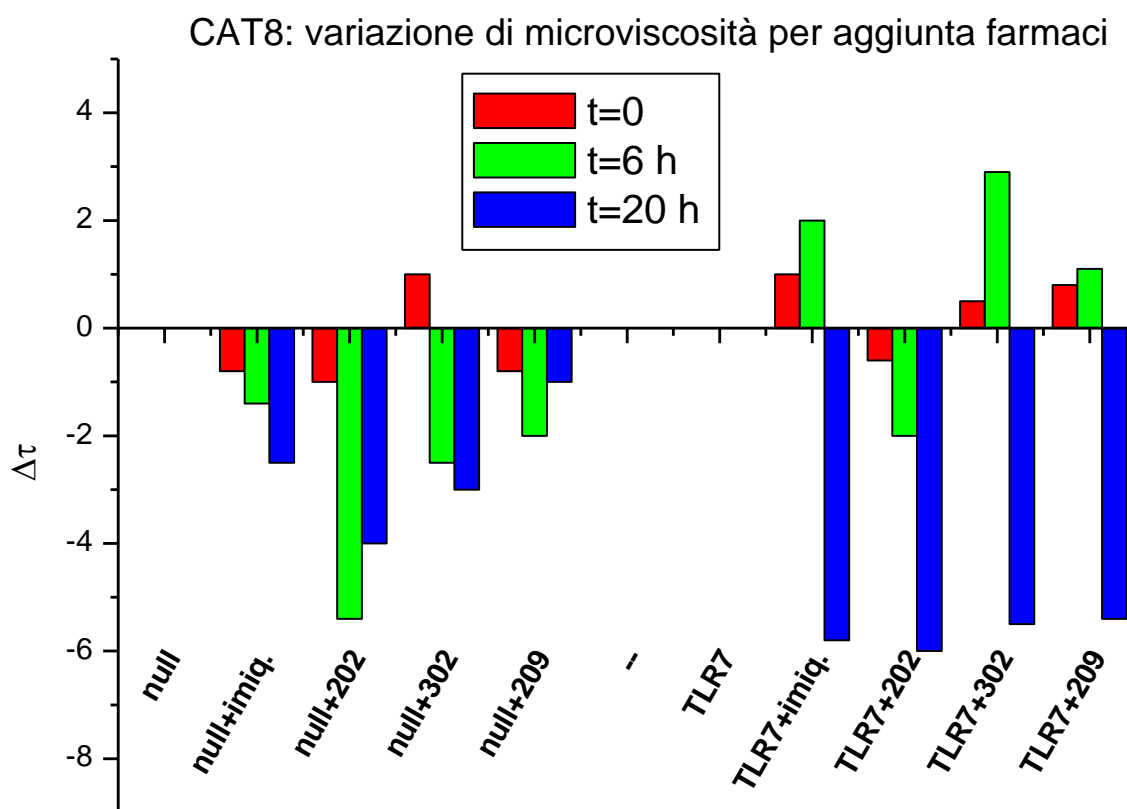
- Per le null a t=0 si ha un piccolo aumento di intensità del segnale EPR per tutti i farmaci tranne che per 302. Anche per questo farmaco si possono ipotizzare interazioni con la sonda oppure un impedimento alla sonda a solubilizzarsi nel sistema
- A t=6 h per le null si ha una significativa inversione di tendenza: imiq e 209 danno una sostanziale diminuzione di intensità, anche questa correlabile ad una variazione strutturale delle cellule. 202 da' una piccolissima diminuzione. La mancata variazione di intensità può essere correlata ad una interazione selettiva della sonda con questo farmaco, anch'esso caratterizzato da parte idrofila e idrofoba.



- Anche in questo caso il farmaco 302 mostra un comportamento diverso, in quanto dà un aumento di intensità che è ancora correlabile all'effetto interattivo e/o protettivo di questo farmaco.
- A  $t=20$  h per le null si ha un inatteso aumento dell'intensità con il farmaco 209 ed anche un piccolo aumento per il 302. Il farmaco 209, come anche il 302, contiene un gruppo COOH e questo può facilitare la solubilizzazione del CAT8 quando il farmaco stesso è maggiormente libero di interagire con la sonda a causa della degradazione cellulare e l'assenza di specie interattive competitive. Invece 202 dà diminuzione di intensità perché probabilmente la parte idrofoba di questo farmaco fa da centro di nucleazione per la sonda che quindi si autoaggrega intorno al farmaco quando entrambi sono liberi di interagire l'uno con l'altro.
- Per le cellule TLR7 è significativo che a  $t=0$  tutti i farmaci danno un decremento di intensità. Questo individua una variazione strutturale delle cellule rispetto alle null, o un effetto del farmaco sulla localizzazione della sonda in zone più esposte ad antiossidanti, o dove l'effetto autoaggregante può prevalere
- A  $t=6$  h la diminuzione di intensità è molto più contenuta e si trasforma in un consistente aumento per il farmaco 302, anche in questo caso correlabile ad interazioni specifiche ed effetto protettivo.
- Infine, a  $t=20$  h, imiq e 202 si comportano come con le cellule null, mentre 302 e 209 si differenziano, in quanto anch'essi mostrano una diminuzione di intensità: a quanto pare, le cellule TLR7 degradate in tempi lunghi sviluppano componenti

chimiche in grado di interagire con la sonda e diminuirne l'intensità in presenza di tutti i farmaci

Ulteriori informazioni si ottengono esaminando la variazione di microviscosità del sistema dovuta all'aggiunta dei farmaci.



Per quanto riguarda la variazione  $\Delta\tau$ , i dati indicano:

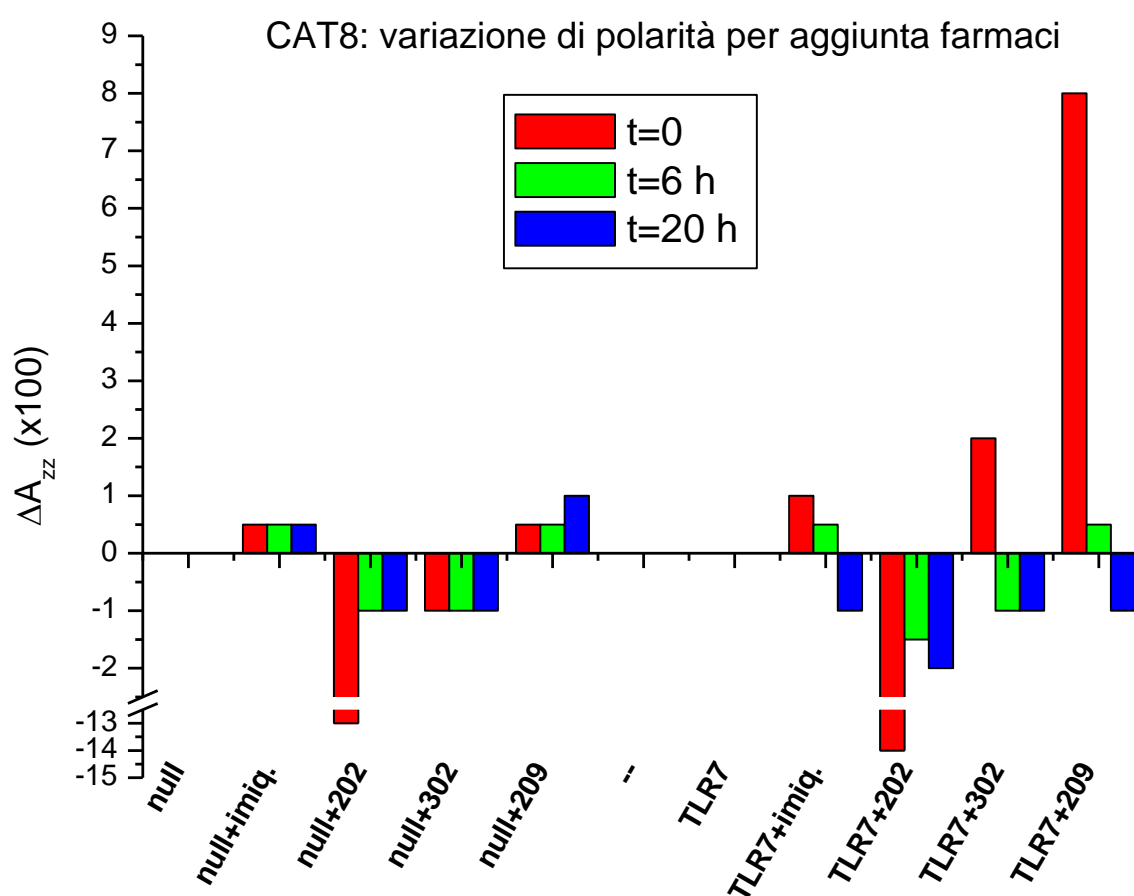
- Per le null a  $t=0$  si ha una piccola diminuzione di microviscosità per tutti i farmaci tranne che per 302 in cui le interazioni più forti provocano un aumento del parametro.
- Tale diminuzione è ben più consistente a  $t=6$  h, soprattutto per 202. Con quest'ultimo farmaco si generano interazioni idrofobiche tra le catene presenti nel farmaco e la catena C8 della sonda che provocano un aumento di fluidità nell'intorno della

sonda. Anche 302, con i gruppi eteri provoca una simile situazione, ma le interazioni sono più forti

- Per le null a  $t=20$  h la diminuzione di microviscosità è un po' maggiore che a  $t=6$  h per imiq e 302 ed un po' minore per 202 e 209. Anche in questo caso diversi effetti concomitanti possono essere responsabili delle suddette variazioni: una diversa degradazione cellulare, il rilascio di antiossidanti e altre biocomponenti in grado di interagire con la sonda o variare la fluidità del sistema, interazioni specifiche che hanno luogo tra gruppi molecolari affini.
- Per le cellule TLR7 a  $t=0$  la microviscosità aumenta, anche se di poco, per imiq, 302 e 209. Considerando che imiq e 209 davano una diminuzione della microviscosità nelle null, questo vuol dire che i farmaci spostano la sonda in zona più viscosa nelle cellule che esprimono in TLR7, probabilmente a causa delle interazioni e variazioni strutturali che i farmaci stessi sono in grado di dare nel sistema. Il 202 invece continua a dare diminuzione di microviscosità anche nelle TLR7. Come detto sopra, questo è certamente dato dalla presenza di catene fluide nel farmaco che, interagendo con la sonda, ne aumentano la fluidità dell'intorno.
- A  $t=6$  h per le TLR7 gli effetti si incentivano rispetto a quanto visto a  $t=0$ , cioè per imiq, 302 e 209 si ha un più consistente aumento di microviscosità. Quindi, a dispetto del processo degradativo che si ha dopo 6 h, le cellule TLR7 continuano a dare per effetto dei farmaci interazioni più significative.
- Come per la sonda 5DSA, anche la sonda CAT8 mostra diminuzioni significative di microviscosità per le cellule TLR7 a  $t=20$  h. Quindi a  $t=20$  h si hanno per TLR7 variazioni strutturali

e di indebolimento delle interazioni ben più consistenti che per le null.

L'ultimo parametro degno di nota è Azz che valuta le variazioni di polarità, anch'esso estratto per simulazione della forma di riga degli spettri EPR. Anche in questo caso, riportiamo in figura le variazioni si Azz causate dall'aggiunta di farmaci alle due diverse linee cellulari e discusse come segue:



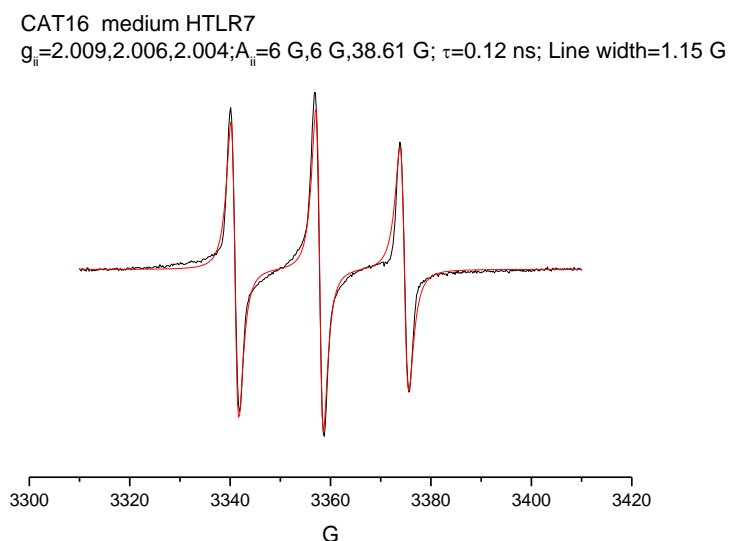
- Per le cellule null, la polarità aumenta di poco sia con imiq che con 209. Con imiq non si hanno sostanziali variazioni anche nel tempo, mentre con 209 si riscontra un piccolo ulteriore aumento di polarità a t=20 h. Quindi per queste cellule i farmaci imiq e 209 generano alla superficie cellulare dove la sonda va a

localizzarsi un piccolo aumento di polarità. Al contrario 202 e 302 generano una diminuzione di polarità alla superficie delle null che diventa molto significativa in presenza del farmaco 202 a  $t=0$ . Questo è in accordo con la presenza di catene idrofobiche che interagiscono con la catena del CAT8 alla superficie cellulare. La degradazione cellulare che ha luogo a  $t=6$  h e poi a  $t=20$  h impedisce in parte questa interazione e quindi la diminuzione di polarità torna ad essere contenuta.

- Per le cellule TLR7 la situazione è più complessa: a  $t=0$ , i farmaci imiq, 302 e 209 danno un aumento di polarità, che è più consistente per 209 in quanto queste cellule lasciano liberi nei farmaci siti di interazione più polari. Questo risulta fortemente evidente appunto per 209. Al contrario per 202 le interazioni idrofobiche sopra descritte permangono preponderanti e abbassano la polarità.
- A  $t=6$  h la polarità si abbassa per tutte e tre le sonde imiq, 302 e 209, ma, mentre per imiq e 209 la variazione rimane positiva rispetto alle cellule senza farmaci, per 302 la variazione diventa negativa, cioè la polarità è minore che senza farmaco. Anche per 202 la variazione permane negativa, ma la diminuzione di polarità è meno consistente che a  $t=0$ . In definitiva la degradazione che si ha a  $t=6$  h provoca una minore differenziazione tra le variazioni di polarità che si hanno per i diversi farmaci.
- Infine a  $t=20$  h tutti e quattro i farmaci generano una diminuzione di polarità, equivalente per tutti tranne che per 202 che origina una variazione maggiore. La diminuzione di polarità è ben associabile ad un fenomeno di degradazione cellulare che libera e rende disponibili siti a bassa polarità anche all'interno della membrana.

## CAT16

CAT16 è solubile in acqua in basse concentrazioni in quanto, avendo una natura anfifilica molto più pronunciata rispetto al CAT8, a causa della catena più lunga, a concentrazioni maggiori di 1 mM genera aggregati micellari. Sulla base della simulazione spettrale in Figura 44, il maggiore ingombro molecolare genera una minore mobilità. Ma i risultati mostrano anche che questa sonda meglio penetrare nelle cellule per raggiungere l'endosoma.

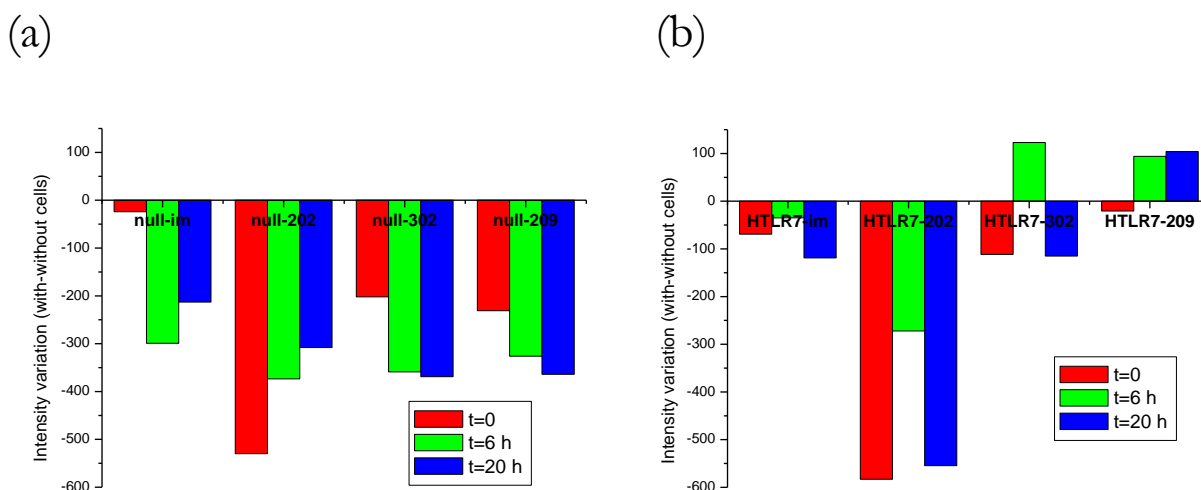


**Figura 44:** simulazione spettrale CAT16

La Figura 45 mostra la variazione di intensità spettrale per Null-farmaci (a), e per HTLR7-farmaci (b).



**Figura 45:**



Tutti i farmaci con le cellule Null generano una diminuzione di intensità. Questo potrebbe essere correlato alla formazione di aggregati CAT16 insieme con i farmaci, soprattutto per 202 a  $t = 0$ , che interagiscono con le cellule e vengono internalizzati. Imiq mostra una minore diminuzione di intensità probabilmente dovuta alla internalizzazione più efficiente dello stesso imiq.

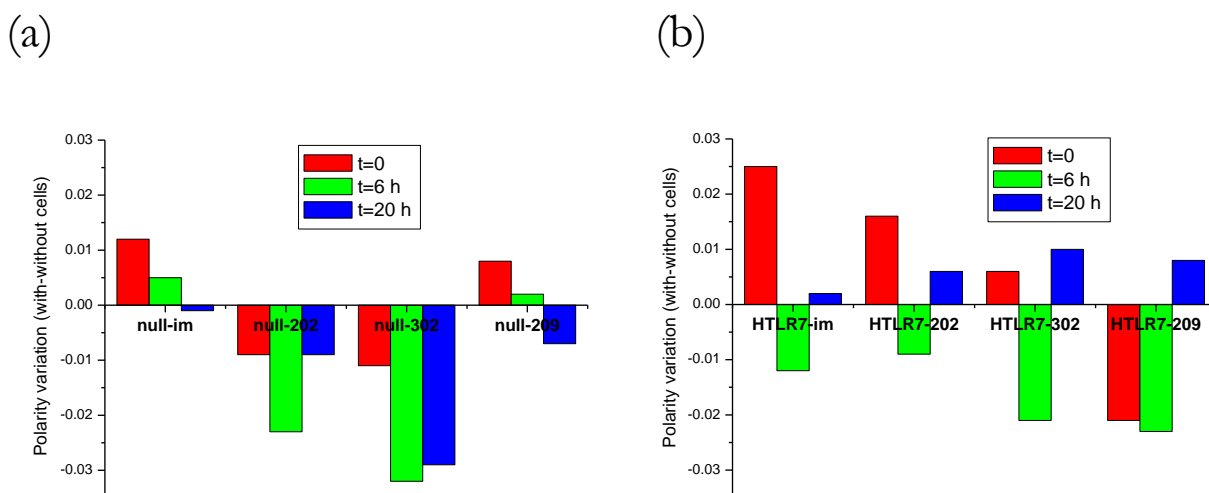
Con HTLR7, solo 202 genera una riduzione significativa di intensità, perché forma aggregati stabili nei quali si inseriscono le sonde CAT16. Tali aggregati si trasferiscono nelle cellule e vanno a interagire con il TLR7 come aggregati. A  $t = 6$  il calo di intensità è più piccolo, perché gli aggregati di 202 si disgregano per interagire con il TLR7. Ma gli altri farmaci interagiscono con il TLR7 principalmente come monomeri, e questo provoca una piccola diminuzione o aumento dell'intensità spettrale, a seconda dell'efficienza del trasferimento e/o la capacità di interagire del farmaco. Per esempio 302 a  $t = 6$  mostra un aumento dell'intensità che indica un'interazione del 302 monomero con il recettore dando una sinergia tra le interazioni idrofobe e idrofile.

La Figura 46 mostra la variazione della polarità monitorata dal parametro Azz: per Null-farmaci (a); e per HTLR7-farmaci (b). Come



per CAT8, notiamo che le variazioni di Azz sono molto piccole, ma la precisione delle misure è nella terza decimale, a causa della elevata risoluzione degli spettri. In questo caso, la polarità della soluzione CAT16 in assenza dei farmaci diminuisce dopo l'aggiunta delle cellule, a causa della internalizzazione della sonda nelle cellule.

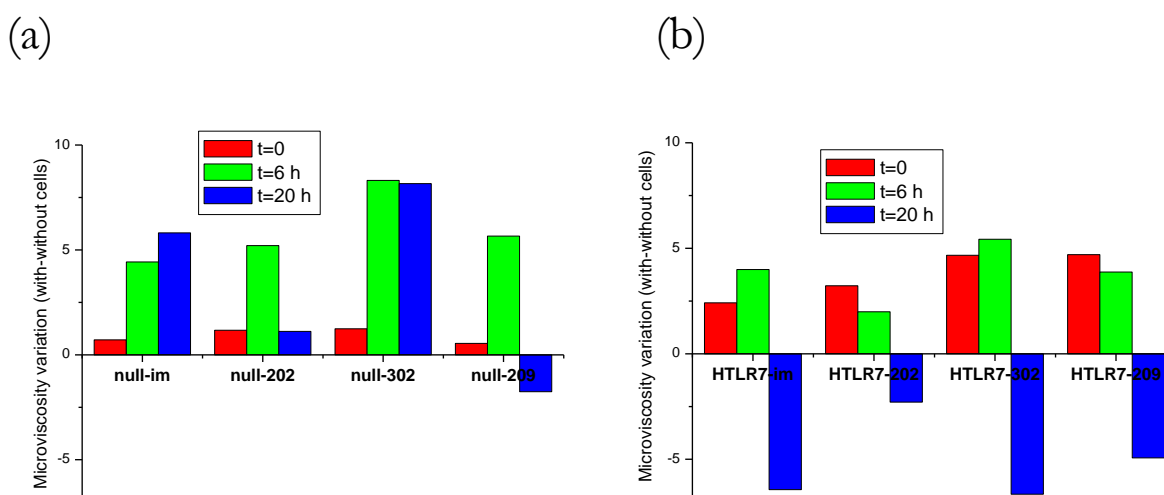
**Figura 46:**



La formazione di aggregati di 202 e 302 che entrano nelle cellule Null è monitorato da sonde CAT16 inserite all'interno degli aggregati che mostrano una diminuzione nella polarità, mentre imiq e 209 mostrano un piccolo aumento nella polarità a causa delle interazioni dei farmaci con la superficie cellulare. Per HTLR7, al tempo  $t = 0$  si verificano aumenti di polarità, soprattutto per imiq che si avvicina e attraversa le cellule in modo più efficiente. Solo 209 mostra una diminuzione nella polarità, probabilmente a causa di interazioni specifiche in siti meno polari. A  $t = 6$  h la polarità diminuisce principalmente per 302 e 209, in linea con l'ingresso della sonda nelle cellule insieme con i farmaci risentendo di un ambiente a minore polarità. Tuttavia, al tempo  $t = 20$  h la polarità aumenta di nuovo dal momento che, probabilmente, le sonde si distaccano dai farmaci che interagiscono con il TLR7.

La Figura 47 mostra la variazione di microviscosità per CAT16, monitorato dal parametro  $\tau$ : per Null-farmaci (a); e per HTLR7-farmaci (b). Qui dobbiamo notare che la microviscosità diminuisce in presenza delle cellule e senza farmaci. Questo comportamento è opposto a quella trovato per CAT8, indicando che l'inserimento di CAT16 nelle cellule provoca la localizzazione del gruppo radicalico CAT in un sito meno interagente.

**Figura 47:**



Per le cellule Null, la microviscosità aumenta, principalmente a  $t = 6$  h, a causadelle interazioni tra le cellule e i farmaci. L'aumento della microviscosità è più significativo per HTLR7 at  $t = 0$  e  $t = 6$  h che per le Null, in quanto i farmaci attraversano le cellule con la sonda per interagire con il recettore. A  $t = 20$  h in HTLR7 la diminuzione di microviscoviscosità può essere correlata alla produzione di TLR7 e il conseguente distacco della sonda dal sito interagente.

In conclusione, è interessante riassumere il comportamento dei farmaci in relazione alla stimolazione del TLR7, sulla base dei risultati EPR delle diverse sonde at  $t = 0-6$  h:

- Imiq è rapidamente interiorizzato e si trasferisce verso il nucleo cellulare. Per HTLR7 le interazioni con il recettore si verificano per mezzo di una sinergia tra interazioni idrofiliche e idrofobiche.
- 202 forma aggregati stabili che favoriscono un'azione cooperativa del farmaco per la stimolazione del recettore. Questo farmaco rappresenta un'evoluzione di imiq.
- 302 forma aggregati poco stabili che si disaggregano sulla superficie cellulare.
- 209 è simile a imiq, ma meno interagente, a causa principalmente di maggiori interazioni idrofobiche e di una parziale aggregazione. Pertanto il suo processo di internazionalizzazione è più lento rispetto all' Imiquimod.

## Risultati del saggio di vitalità cellulare

Il saggio di vitalità cellulare del Trypan Blue è risultato fondamentale per valutare la tossicità dei farmaci sperimentali, all'interno di un sistema biologico, che è rappresentato dalle linee cellulari HTLR7 e Null.

**T=0 h**

	<b>CTR</b>	<b>IMIQ</b>	<b>209</b>	<b>202</b>	<b>302</b>
<b>NULL</b>	4%	7%	15%	17%	14%
<b>HTLR7</b>	2%	15%	15%	10%	14%

**T=6 h**

	<b>CTR</b>	<b>IMIQ</b>	<b>209</b>	<b>202</b>	<b>302</b>
<b>NULL</b>	8%	22%	28%	47%	30%
<b>HTLR7</b>	6%	17%	12%	17%	10%

**T=20 h**

	<b>CTR</b>	<b>IMIQ</b>	<b>209</b>	<b>202</b>	<b>302</b>
<b>NULL</b>	6%	17%	29%	30%	26%
<b>HTLR7</b>	5%	11%	24%	11%	17%

**Figura 48:** Tabelle con le percentuali delle cellule morte durante il saggio di vitalità cellulare del Trypan Blue, nei tre tempi presi in considerazione.

Dall'attenta analisi dei risultati ottenuti è risultato che:

- $t=0$ , la percentuale delle cellule morte è piuttosto bassa, sottolineando che la tossicità, sia per le Null che le HTLR7, è tollerabile.
- $t=6$ , la citotossicità dei farmaci inizia ad aumentare soprattutto per le Null.
- $t=20$ , la tossicità diminuisce per i farmaci, ad eccezione dell'1V209.

Per quanto riguarda l'Imiquimod, presenta un comportamento simile agli altri farmaci, pur avendo un picco piuttosto alto di citotossicità a  $t=6$ , per poi andare a decresce con il passare del tempo, con una percentuale di cellule morte maggiore con le Null. La ridotta citotossicità del farmaco in relazione alle cellule HTLR7, è dovuto molto probabilmente alla presenza dei TLR7 che vanno ad inibire e a ridurre l'attività dannosa di questo farmaco in quanto attrae il farmaco nell'endosoma e ne diminuisce l'effetto distruttivo.

## CONCLUSIONI

---

Di seguito verranno esposte le conclusioni ottenute per ogni singola linea di ricerca, per le quali la risonanza paramagnetica elettronica si è dimostrata una valida metodica applicabile nello studio di differenti sistemi interagenti di natura biologica.

*Prima linea di ricerca: farmaci dendrimerici con gruppi maltosio e solfato complessati con ioni rame per la cura dell'Alzheimer*

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato quello di dimostrare l'effettiva valenza nell'utilizzo di glicodendrimeri, PPI-G5, per impedire "tamponare" l'interazione degli ioni  $\text{Cu(II)}$  con il peptide  $\text{A}\beta$  che viene ritenuta in buona parte responsabile della variazione strutturale del peptide che genera le fibrille responsabili dell'insorgenza dell'Alzheimer.

Abbiamo preventivamente analizzato i sistemi binari:

- $\text{Cu(II)}$  con il peptide  $\text{A}\beta$ ,
- $\text{Cu(II)}$  con il solo dendrimero.

Si è osservato come il rame interagente con il dendrimero passi da una coordinazione di tipo  $\text{Cu-N}_2\text{O}_2$  ad una coordinazione  $\text{Cu-NO}_3/\text{Cu-O}_4$ , quando aumenta il rapporto molare tra gli ioni ed i siti superficiali del dendrimero, questo indica che quando il rame è presente a basse concentrazioni va ad occupare dei siti di coordinazione interni al dendrimero ricchi di gruppi azotati, una volta saturati questi, il rame si va a coordinare al dendrimero andando ad occupare i siti esterni, più ricchi di gruppi ossigenati per poi essere confinato all'esterno del dendrimero.

I siti ossigenati possono derivare sia dai gruppi solfato che dalle molecole che compongono il tampone.

Il sistema di coordinazione Cu-O<sub>4</sub> mostra una notevole mobilità a temperatura ambiente, rispetto alle altre componenti che sembrano essere molto meno mobili, poiché gli ioni risultano intrappolati in strutture compatte e poco flessibili.

Per il sistema binario Cu(II)+A $\beta$ , variando la concentrazione di Cu(II) le quantità relative delle due componenti variano di poco e comunque risulta maggioritaria la cosiddetta *Componente 1* che implica una coordinazione più stretta con i gruppi imidazolici.

L'aggiunta del dendrimero al sistema binario Cu(II)+A $\beta$  non determina cambiamenti delle interazioni fino a concentrazioni equimolari tra i siti superficiali del dendrimero ed il peptide, facendo intendere che, a basse concentrazioni, il dendrimero non sia in grado di perturbare i complessi Cu-A $\beta$ ; ma a concentrazioni di dendrimero uguali o maggiori dell'equimolarità, si sono verificate delle variazioni corrispondenti alla sparizione del segnale EPR in soluzione tampone. A queste concentrazioni, il dendrimero lega il peptide A $\beta$ , legame che implica l'estromissione degli ioni Cu(II) dai siti di legame del peptide. In tale condizione gli ioni rimangono intrappolati all'interfase dendrimero/peptide e, a causa di forti interazioni spin-spin, il segnale EPR non è più visibile.

Questo fenomeno di intrappolamento avviene in presenza della soluzione tampone in quanto, se il pH diminuisce in acqua, i peptidi vengono protonati e l'interazione con il dendrimero non può avvenire per cui gli ioni tornano ad interagire con i gruppi solfato superficiali del dendrimero e con le molecole di acqua dando origine alla coordinazione Cu-O<sub>4</sub>.

Dalle analisi a temperatura ambiente (298K) si sono riscontrate anche delle differenze nella mobilità dei complessi del Cu(II).

Infatti gli spettri a temperatura ambiente mostrano condizioni di mobilità molto bassa (se si esclude il complesso Cu-O<sub>4</sub>), che è simile a quella riscontrata a bassa temperatura. Questo indica che già a temperatura ambiente gli ioni interagenti con il dendrimero e/o il peptide sono bloccati in interazioni forti, anche in correlazione con la

struttura poco flessibile del dendrimero e con la chelazione dei gruppi azotati del peptide.

Dallo studio effettuato si può evidenziare come questi sistemi macromolecolari non tossici (per merito della funzionalizzazione con gruppi maltosio) siano validi nel perturbare l'effetto indotto dal rame nell'organismo affetto da Alzheimer e pertanto potenzialmente idonei per la fase di sperimentazione ospedaliera.

Il glicodendrimero utilizzato in questo lavoro non è ancora stato utilizzato per dei clinical trials, ma è ora in corso uno studio basato su prove di tossicità mediante l'impiego di linee cellulari, presso il gruppo di ricerca della Dott. B.Klajnert a Lodz, Polonia.

### *Seconda linea di ricerca: Dendrimeri fosforilati con funzionalità chemioterapiche e complessati con Cu(II) per la cura del cancro*

Recentemente in ambito farmacologico i dendrimeri si sono rivelati degli ottimi vettori di farmaci per merito della loro biocompatibilità, la dimensione nanometrica e soprattutto per la possibilità di funzionalizzare la superficie con concentrazioni controllate di farmaci che quindi non vengono immessi in eccesso nell'organismo come invece purtroppo avviene nelle usuali cure chemioterapiche. I farmaci, legati fisicamente o chimicamente ai dendrimeri, sono veicolati direttamente al livello del sito patologico in modo da distruggere selettivamente le cellule malate risparmiando quelle sane. Tali dendrimeri possono poi essere somministrati anche per via cutanea o intraoculare.

Nella prima fase sperimentale sono state analizzate tre strutture dendrimeriche differenziate sulla base del gruppo funzionale esterno con i monomeri A, B e C; di ogni famiglia dendrimerica è stato studiato il comportamento delle diverse generazioni, le loro rispettive strutture e le differenti capacità di interagire con gli ioni Cu (II) sulla loro superficie.

In più, dopo un'accurata analisi EPR è possibile avere dettagliate



informazioni riguardo ai diversi modelli di coordinazione, alla mobilità e stabilità dei complessi all'aumentare della concentrazione ionica.

Si è visto che le varie possibilità di coordinazione identificate, ovvero  $\text{CuN}_4$ ,  $\text{CuN}_3\text{O}$ ,  $\text{CuN}_2\text{O}_2$  e  $\text{CuNO}_3$ , dipendevano fortemente dalla generazione e dalla natura dei ligandi che decoravano la superficie esterna dei dendrimeri.

In tutti i casi una volta che i siti di coordinazione del dendrimero sono saturati, gli ioni vengono confinati esternamente in una coordinazione  $\text{CuO}_4$  con il solvente.

Si è quindi dimostrato che tra tutti i complessi di dendrimeri analizzati, spiccava il complesso Cu-G3B il quale, con la più stabile coordinazione  $\text{CuN}_2\text{O}_2$ , è il migliore nel mostrare un'attività antitumorale e una maggiore selettività nei confronti della linea cellulare tumorale HCT-116.

Nella seconda parte dello studio abbiamo quindi utilizzato il complesso Cu(II)-G3B per verificare le modalità di interazione con le cellule cancerogene HCT-116 usando come sistema di confronto cellule equivalenti non cancerogene.

*Terza linea di ricerca: Caratterizzazione di nuovi farmaci prodotti dalla ditta Telormedix (Manno-Ch) stimolatori del TLR7 in presenza e assenza di cellule in grado di esprimere tale recettore.*

La sperimentazione di quattro differenti farmaci antitumorali, tutti appartenenti alla classe degli agonisti del Toll like receptor 7, è stata finalizzata allo studio e al monitoraggio delle dinamiche chimico-fisiche relative alle interazioni esistenti tra i suddetti composti e le due linee cellulari sulle quali sono stati testati.

Lo studio è stato condotto sulla linea cellulare HTLR7 in grado di esprimere il recettore TLR7, e la linea cellulare corrispondente inattiva, denominata Null, mediante l'impiego di sonde radicaliche, CAT8, CAT16 e 5DSA, in grado di fornire informazioni relative alle

interazioni extra ed intracellulari, evidenziare i vantaggi/svantaggi dei nuovi farmaci rispetto a quello in commercio, ed informazioni relative alle variazioni strutturali delle membrana cellulare.

Gli spettri, registrati a 37°C per mimare l'omeostasi tissutale, hanno permesso di ottenere dati significativi valutando alcuni parametri caratterizzanti gli spettri EPR e ottenuti tramite simulazione della forma di riga. I suddetti parametri, che hanno permesso di valutare il comportamento dei farmaci all'interno dei vari sistemi sono informativi sulle interazioni che hanno luogo all'interno dei sistemi studiati, misurando la microviscosità, la polarità, l'intensità spettrale e la presenza di antiossidanti. In base alla loro struttura, i farmaci assumono comportamenti differenti a seconda della tipologia di terreno impiegato, e in presenza/assenza delle linee cellulari utilizzate. Si è potuto così ottenere le seguenti informazioni:

l'Imiquimod interagisce poco con le membrane, da ciò ne deriva una veloce internalizzazione, quindi una cinetica d'azione rapida, specialmente nei confronti della linea cellulare HTLR7, grazie alla presenza dei recettori che fungono da attrattori nei confronti del farmaco.

Il farmaco 1V209, si presenta libero in soluzione, interagisce poco con la membrana ma presenta una cinetica di interazione con l'endosoma più lenta.

Il TMX202 tende a formare aggregati stabili che permangono anche durante l'attraversamento della membrana con la quale interagisce maggiormente grazie alla presenza delle code fosfolipidiche che lo costituiscono. Anche se viene meglio internalizzato rispetto ad altri farmaci, è caratterizzato da una cinetica molto lenta poiché la rottura degli aggregati si ha tardivamente dopo il riconoscimento con i recettori TLR7.

Il TMX302, forma aggregati instabili che si dissociano durante il passaggio in membrana, facendo sì che giunga nel citosol sotto forma di monomeri. È caratterizzato da una cinetica lenta e viene impiegato

come antagonista dei recettori.

Le informazioni relative alla citotossicità dei farmaci hanno rilevato un aumento della mortalità cellulare dopo le 20 ore per le cellule Null rispetto alle cellule HTRL7, sulla base di questi risultati è lecito ipotizzare un ruolo protettivo del recettore TLR7 nei confronti dell'azione tossica esplicita dai farmaci antitumorali che agiscono come agonisti del recettore stesso.

È possibile affermare che la tecnica EPR si è rivelata efficace e valida per questo tipo di sperimentazione, permettendo di ottenere informazioni significative relative all'interazione tra i farmaci e le linee cellulari, con diverse tempistiche di attivazione del recettore TLR7. I risultati ottenuti sono anche utili per la comprensione della funzionalità delle sonde radicaliche nello studio dei sistemi complessi come quelli trattati.

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Donald A. Tomalia, Jean M. J. Fréchet, "Discovery of Dendrimers and Dendritic Polymers: A Brief Historical Perspective" Received 20 November 2001; accepted 28 November 2001 Published online in Wiley InterScience.
2. Egon Buhleier, Winfried Webner, Fritz Vögtle (1978). "Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies". *Synthesis* 1978: 155–158.
3. T. Emrick and J.M.J. Fréchet, *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.*, 1999, 4, 15.
4. D.A. Tomalia, D.M. Hedstrand and M.S. Ferritto, *Macromolecules*, 1991, 24, 1435.
5. J.P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 5409
6. J.P. Tam, *Synthesis of peptides and peptidomimetics*, Houben-Weyl Methods of organic chemistry, in *Peptide Dendrimers and Protein Mimetics*, M. Goodman(ed), Thieme, Stuttgart, 2000
7. E. Buhleier, W. Webner and F. Vögtle, *Synthesis*, 1978, 155–158.
8. D.A. Tomalia, J.R. Dewald, M.R. Hall, S.J. Martin and P.B. Smith, *Preprints 1<sup>st</sup> SPSJ Polym. Conf., Soc. Polym. Sci. Jpn.*, Kyoto, 1984, 65.
9. D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder and P. Smith, *Polym. J.*, 1985, 17, 117–132.
10. C. Hawker and J.M.J. Fréchet, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, 1010
11. C.J. Hawker, K.L. Wooley and J.M.J. Fréchet, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1*, 1993, 128719.
12. Wu, J. Y., Zhou, J. H., Qu, F. Q., Bao, P. H., Zhang, Y., and Peng, L. (2005) Polycationic dendrimers interact with RNA molecules: polyamine dendrimers inhibit the catalytic activity of *Candida ribozymes*. *Chem. Commun.* 3, 313–315.
13. Liu, X. X., Liu, C., Laurini, E., Posocco, P., Prich, S., Qu, F. Q., Rocchi, P., and Peng, L. (2012) Efficient delivery of sticky siRNA and potent gene silencing in a prostate cancer model using a generation 5 triethanolamine-core PAMAM dendrimer. *Mol. Pharm.* 9, 470–481.
14. Wiesler, U. M., Weil, T., and Mullen, K. (2001) Nanosized polyphenylene dendrimers. *Topics in Current Chemistry Volume 212: Dendrimers in: Design, Dimension, Function.* (Vögtle F., Eds.) pp 1–40, Chapter 1, Springer Berlin Heidelberg.

- 15 Turp, D., Nguyen, T. T. T., Baumgarten, M., and Mullen, K. (2012) *Uniquely versatile: nano-site defined materials based on polyphenylene dendrimers*. *New J.Chem.* 36, 282-298.
- 16 Cardona, C. M., and Gawley, R. E. (2002) *An improved synthesis of a trifurcated newkome-type monomer and orthogonally protected two-generation dendrons*. *J. Org.Chem.* 67, 1411-1413.
- 17 Majoral, J. P., Caminade, A. M. (2003) *What to do with phosphorus in dendrimer chemistry*. *Top. Curr. Chem.* 223, 111-159.
- 18 Mignani, S., El Kazzouli, S., Bousmina, M. M., and Majoral, J. P. (2014) *Dendrimer space exploration: An assessment of dendrimers/dendritic scaffolding as inhibitors of protein-protein interactions, a potential new area of pharmaceutical development*. *Chem. Rev.* 114, 1327-1342.
- 19 Feliu, N., Walter, M. V., Montanez, M. I., Kunzmann, A., Hult, A., Nystrom, A., Malkoch, M., and Fadeel, B. (2012) *Stability and biocompatibility of a library of polyester dendrimers in comparison to polyamidoamine dendrimers*. *Biomaterials* 33, 1970-1981
- 20 Fuentes-Paniagua, E., Hernandez-Ros, J. M., Sanchez-Milla, M., Camero, M. A., Mahy, M., Perez-Serrano, J., Copa-Patino, J. L., Sanchez-Nieves, J., Soliveri, J., Gomez, R. et al. (2014) *Carbosilane cationic dendrimers synthesized by thiol-ene click chemistry and their use as antibacterial agents*. *RSC Adv.* 4, 1256-1265.
- 21 Tomalia, D.A. *Aldrichimica Acta*, 2004, 37, 39-57
- 22 Tomalia, D.A. & Dvornic, P.R. (1994) "What promise for dendrimers?" *Nature* 372, 617-618
- 23 Boas, U.; Heegaard, P.M.H. *Chem. Soc. Rev.* 2004, 33, 43-63.
- 24 Bubleier, E.; Webner, W.; Vogtle, F. *Synthesis* 1978, 155-158
- 25 Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* 1985, 17, 117.
- 26 Hawker, C.J.; Wooley, K.L.; Frechet, J.M.J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1993, 1287-1297.
- 27 Hawker, C. J., Wooley, K. L., and Fréchet, J. M. J. (1993) *Unimolecular micelles and globular amphiphiles: dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1287.
- 28 (15) Grayson, S. M., Frechet, J. M. (2001) *Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications*. *Chem. Rev.* 101, 3819-3867.
- 29 D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard III, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 138.

- 30 C. Loup, M. A. Zanta, A. M. Caminade, J. P. Majoral, B. Meunier, *Chem. Eur. J.* 1999, 5, 3644.
- 31 J. Solassol, C. Crozet, V. Perrier, J. Leclaire, F. Be' ranger, A. M. Caminade, B. Meunier, D. Dormon, J. P. Majoral, S. Lehmann, *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 1791.
- 32 C. Marmillon, F. Gauffre, T. Gulik-Krzywicki, C. Loup, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, J.-P. Vors, E. Rump, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40 (2001) 2626.
- 33 D. K. Smith, F. Diederich, *Functional dendrimers: Unique biological mimics.* *Chem. Eur. J.* 1998.4, 1353–1361.
- 34 S. Hecht, J. M. J. Fre'chet, *Dendritic encapsulation of function: Applying Nature's site isolation principle from biomimetics to materials science.* *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001. 40, 74–91.
- 35 A. Esposito, E. Delort, D. Lagnoux, F. Djojo, J.-L. Reymond, *Catalytic peptide dendrimers.* *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003. 42, 1381–1383.
- 36 14 A. Clouet, T. Darbre, J.-L. Reymond, *A combinatorial approach to catalytic peptide dendrimers.* *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. 43, 4612–4615.
- 37 B. Klajnert, M. Bryszewska, *Dendrimers: Properties and applications.* *Acta Biochim. Pol.* 2001.48, 199–208.
- 38 B. Chen, S. Piletsky, A. P. Turner, *High molecular recognition: Design of "Keys".* *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2002. 5, 409–427.
- 39 A. Mecke, I. Lee, J. R. Baker Jr, M. M. Holl, B. G. Orr, *Deformability of poly(amidoamine) dendrimers.* *Eur. Phys. J. E Soft Matter* 2004. 14, 7–16.
- 40 Agarwal, A.; Saraf, S.; Asthana, A.; Gupta, U.; Gajbhiye, V.; Jain, N.K. *Int. J. Pharm.* 2008, 350, 3-13.
- 41 Wallimann, P.; Marti, T.; Furer, A.; Diederich, F. *Chem. Rev.* 1997, 97, 1567-1608.
- 42 Boas, U.; Sontjens, S.H.; Jensen, K.J.; Christensen, J.B.; Meijer, E.W. *ChemBiochem.* 2002, 3, 433-439.
- 43 Bielinska, A.U., Kukowska-Latallo, J.F., Johnson, J., Tomalia, D.A. & Baker, J.R. (1996) "Regulation of *in vitro* gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers." *Nucleic Acids Res.* 24, 2176–2182.

- 44 Kukowska-Latallo, J.F., Raczka, E., Quintana, A., Chen, C.L., Rymaszewski, M. & Baker, J.R. (2000) "Intravascular and endobronchial DNA delivery to murine lung tissue using a novel, nonviral vector". *Hum. Gene Therapy* 11, 1385–1395.
- 45 Bubleier, E.; Webner, W.; Vogtle, F. *Synthesis* 1978, 155-158.
- 46 Sadler, K.; Tam, J.P. *Rev. Mol. Biotechnol.* 2002, 90, 195-229.
- 47 Bay, S.; Lo-Man, R.; Osinaga, E.; Nakada, H.; Leclerc, C.; Cantacuzene, D. J. *Pept. Res.* 1997, 49, 620-625
- 48 Bosman, A.W.; Janssen, H.M.; Meijer, E.W. *Chem. Rev.* 1999, 99, 1665-1688.
- 49 Lee, C. C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M., and Szoka, F. C. (2005) Designing dendrimers for biological applications. *Nat. Biotechnol.* 23, 1517-1526. 50 Dufès, C., Uchegbu, I. F., and Schätzlein, A. G. (2005) Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2177-2202.
- 51 Mintzer, M. A., and Grinstaff, M. W. (2011) Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem. Soc. Rev.* 40, 173-190.
- 52 Jain, N. K., and Gupta, U. (2008) Application of dendrimer-drug complexation in the enhancement of drug solubility and bioavailability. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8, 1035-1052.
- 53 Yiyun, C., Tongwen, X., and Rongqiang, F. (2005) Polyamidoamine dendrimers used as solubility enhancers of ketoprofen. *Eur. J. Med. Chem.* 40, 1390-1393.
- 54 Grayson, S. M., Frechet, J. M. (2001) Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications. *Chem. Rev.* 101, 3819-3867.
- 55 Ihre, H. R., Padilla De Jesús, O. L., Szoka, F. C., and Fréchet, J. M. (2002) Polyester dendritic systems for drug delivery applications: design, synthesis, and characterization. *Bioconjug. Chem.* 13, 443-452.
- 56 Pasut, G., Scaramuzza, S., Schiavon, O., Mendichi, R., and Veronese, F. M. (2005) PEG-epirubicin conjugates with high drug loading. *J. Bioact. Compat. Polym.* 20, 213-230.
- 57 Chen, H. T., Neerman, M. F., Parrish, A. R., and Simanek, E. E. (2004) Cytotoxicity, hemolysis, and acute in vivo toxicity of dendrimers based on melamine, candidate vehicles for drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 10044-10048.
- 58 Newkome, G. R., and Shreiner, C. D. (2008) Poly(amidoamine), polypropylenimine, and related dendrimers and dendrons possessing different 1→2 branching motifs: An overview of the divergent procedures. *Polymer* 49, 1-173.

- 59 Newkome, G. R., and Shreiner, C. (2010) Dendrimers Derived from 1→3 Branching Motifs. *Chem. Rev.* 110, 6338-6442.
- 60 Aillon, K. L., Xie, Y., El-Gendy, N., Berkland, C. J., and Forrest, M. L. (2009) Effects of nanomaterial physicochemical properties on *in vivo* toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 457-466.
- 61 (103) Jerprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N., and D'emanuele, A. (2003) The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* 252, 263-266.
- 62 Moghimi, S. M., Andersen, A. J., Ahmadvand, D., Wibroe, P. P., Andresen, T. L., and Hunter, A. C. (2011) Material properties in complement activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1000-1007.
- 63 Cubillos, C., Beatriz, G., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Bárcena, J., Andreu, D., Sobrino, F., and Blanco, E. (2008) Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *J. Virol.* 82, 7223-7230.
- 64 Andersen, A. J., Wibroe, P. P., and Moghimi, S. M. (2012) Perspectives on carbon nanotube-mediated adverse immune effects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 1700-1705.
- 65 Akesson, A., Cardenas, M., Elia, G., Monopoli, M. P., and Dawson, K. A.
- 66 Janaszewska, A., Ciolkowski, M., Wrobel, D., Petersen, J. F., Ficker, M., Christensen, J. B., Bryszewska, M., and Klajnert, B. (2013) Modified PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone surface groups reveals negligible toxicity against three rodent cell-lines. *Nanomedicine* 9, 461-4.
- 67 Tziveleka, L. A., Psarra, A. M. G., Tsiourvas, D., and Paleos, C. M. (2007) Synthesis and characterization of guanidinylated poly(propylene imine) dendrimers as gene transfection agents. *J. Control. Release* 117, 137-146.
- 68) Shi, X., Wang, S., Sun, H., and Baker, J. R. (2007) Improved biocompatibility of surface functionalized dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Soft Matter* 3, 71- 74.
- 69 Lee, J. H., Lim, Y. B., Choi, J. S., Lee, Y., Kim, T. I., Kim, H. J., Yoon, J. K., Kim, K., and Park, J. S. (2003) Polyplexes assembled with internally quaternized PAMAM-OH dendrimer and plasmid DNA have a neutral surface and gene delivery potency. *Bioconjug. Chem.* 14, 1214-1221.
- 70 (114) Patil, M. L., Zhang, M., Taratula, O., Garbuzenko, O. B., He, H., and Minko, T. (2009) Internally cationic polyamidoamine PAMAM-OH dendrimers for siRNA delivery: effect of the degree of quaternization and cancer targeting. *Biomacromolecules* 10, 258-266.
- 71 Arima, H., Kihara, F., Hirayama, F., and Uekama, K. (2001) Enhancement of gene expression by polyamidoamine dendrimer conjugates with  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cyclodextrins. *Bioconjug. Chem.* 12, 476-484.



- 72 Navath, R. S., Kurtoglu, Y. E., Wang, B., Kannan, S., Romero, R., and Kannan, R. M. (2008) *Dendrimer–Drug Conjugates for Tailored Intracellular Drug Release Based on Glutathione Levels*. *Bioconj. Chem.* 19, 2446-2455.
- 73 Sashiwa, H., Yajima, H., and Aiba, S. I. (2003) *Synthesis of a chitosandendrimer hybrid and its biodegradation*. *Biomacromolecules* 4, 1244-1249.
- 74) Kwok, A., Eggimann, G. A., Raymond, J. L., Darbre, T., and Hollfelder, F. (2013) *Peptide dendrimer/ lipid hybrid systems are efficient DNA transfection reagents: structure–activity relationships highlight the role of charge distribution across dendrimer generations*. *ACS Nano* 7, 4668-4682.
- 75 Ciolkowski, M., Petersen, J. F., Ficker, M., Janaszewska, A., Christensen, J. B., Klajnert, B., and Bryszewska, M. (2012) *Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility*. *Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.* 8, 815-7.
- 76 Stasko, N. A., Johnson, C. B., Schoenfisch, M. H., Johnson, T. A., and Holmuhamedov, E. L. (2007) *Cytotoxicity of polypropylenimine dendrimero conjugates on cultured endothelial cells*. *Biomacromolecules* 8, 3853-3859.
- 77 Malik, N., Winattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J., Meijer, E., Paulus, W., and Duncan, R. (2000) *Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo*. *J. Control. Release* 65, 133-148.
- 78 Hall, A., Larsen, A. K., Parhamifar, L., Meyle, K. D., Wu, L. P., and Moghimi, S. M. (2013) *High resolution respirometry analysis of polyethyleniminemediated mitochondrial energy crisis and cellular stress: Mitochondrial proton leak and inhibition of the electron transport system*. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1827, 1213-1225.
- 79 Parhamifar, L., Andersen, H., Wu, L., Hall, A., Hudzecz, D., and Moghimi, S.M. (2014) *Polycation-mediated integrated cell death processes*. *Adv. Genet.* 88, 353-98.
- 80 *Science* 20 December 2013: Vol. 342 no. 6165 pp. 1432-1433 DOI: 10.1126/science.342.6165.1432 *News Cancer Immunotherapy*
- 81 C. June et al., “T-Cell Therapy at the Threshold,” *Nat. Biotechnol.* 30, 7 (July 2012).
- 82 S. L. Topalian et al., “Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer,” *N. Engl. J. Med.* 366, 26 (28 June 2012).
- 83 D. M. Pardoll, “Immunology Beats Cancer: A Blueprint for successful translation”. *Nat. Immunol.* 13 december 2012 .

- 84 D. R. Leach, M. F. Krummel, J. P. Allison, "Enhancement of antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade" *Science* 271, 5226 (22 march 1996).
- 85 H. Dong et al. "Tumor-Associated B7-H1 promotes T-cell Apoptosis: A potential Mechanism of Immune Evasion" *Nat. Med.* 8, (8 August 2002).
- 86 J. Couzin-Frankel, "Immune Therapy step up the attack". *Science* 330, 6003 (22 October 2010).
- 87 Couzin-Frankel, "The dizzying Journey to a New Cancer Arsenal" *Science* 340, 6140 (28 June 2013).
- 88 J. D. Wolchok et al, "Nivolumab plus Ipilimumab in advanced melanoma," *N. Engl. J. Med* 369, 2 (11 July 2013).
- 89 Miller, R.L. et al. (1999) Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int. J. Immunopharmacol.* 21, 1–14
- 90 Stanley, M.A. (2002) Imiquimod and the imidazoquinolines: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin. Exp. Dermatol.* 27, 571–577
- 91 L.A.J. (2005) Immunity's early-warning system. *Sci. Am.* 292, 24–31
- 92 Janeway, C.A. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Ann.Rev. Immunol.* 20, 197–216
- 93 Hemmi H, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2002;3(2):196–200.
- 94 Mol Cell Biol. 1995 Apr;15(4):2207-18.Stimulation of interferon and cytokine gene expression by imiquimod and stimulation by Sendai virus utilize similar signal transduction pathways.Megyeri K<sup>1</sup>, Au WC, Rosztoczy I, Raj NB, Miller RL, Tomai MA, Pitha PM..Mol Cell Biol 1995 May;15(5):2905.
- 95 Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod Sheila J. Gibson,<sup>a</sup> Jana M. Lindh,<sup>a</sup> Tony R. Riter,<sup>a</sup> Raymond M. Gleason,<sup>a</sup> Lisa M. Rogers,<sup>a</sup> Ashley E. Fuller,<sup>a</sup> JoAnn L. Oesterich,<sup>a</sup> Keith B. Gorden,<sup>a</sup> Xiaohong Qiu,<sup>a</sup> Scott W. McKane,<sup>b</sup> Randy J. Noelle,<sup>c</sup> Richard L. Miller,<sup>a</sup> Ross M. Kedl,<sup>a</sup> Patricia Fitzgerald-Bocarsly,<sup>d</sup> Mark A. Tomai,<sup>a</sup> and John P. Vasilakos,<sup>\*</sup> Received 16 April 2002; accepted 21 August 2002
- 96 Bishop GA, Hsing Y, Hostager BS, Jalukar SV, Ramirez LM, Tomai MA. Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848. *J Immunol.* 2000 Nov 15;165(10):5552–7.

- 97 Bishop GA, Ramirez LM, Baccam M, Busch LK, Pederson LK, Tomai MA. The immune response modifier resiquimod mimics CD40-induced B cell activation. *Cell Immunol.* 2001 Feb 25;208(1):9–17.
- 98 Vidal D, Matias-Guiu X, Alomar A. Efficacy of Imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki67, p53 and basal cell carcinoma apoptosis. *Br J Dermatol.* 2004 Sep;151(3):656–62.
- 99 Schon MP, Wienrich BG, Drenniok C, et al. Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Invest Dermatol.* 2004 May;122(5):1266–76
- 100 Chan M, Hayashi T, Kuy CS, et al. Synthesis and immunological characterization of toll-like receptor 7 agonistic conjugates. *Bioconjug Chem* 2009; 20: 1194-200.
- 101 PLoS One. 2012; 7(9): e45860. Published online 2012 Sep 28. doi: 10.1371/journal.pone.0045860PMCID: PMC3461028 Treatment of Autoimmune Inflammation by a TLR7 Ligand Regulating the Innate Immune System Tomoko Hayashi,<sup>1</sup>Shiyin Yao,<sup>1</sup>Brian Crain,<sup>1</sup>Michael Chan,<sup>1</sup>Rommel I. Tawatao,<sup>1</sup>Christine Gray,<sup>1</sup>Linda Vuong,<sup>1</sup>Fitzgerald Lao,<sup>1</sup>Howard B. Cottam,<sup>1</sup>Dennis A. Carson,<sup>1</sup> and Maripat Corr<sup>2,\*</sup> Laurel L. Lenz, Editor
- 102Journal of Drug Delivery Volume 2012 (2012), Article ID 103973, 17 pages Poly(ethylene glycol)-Prodrug Conjugates: Concept, Design, and Applications Shashwat S. Banerjee,<sup>1</sup> Naval Aber,<sup>1</sup> Rajesh Patil,<sup>2</sup> and Jayant Khandare<sup>1</sup>
- 103 Crain B., Yao S., Keophilaone V., Promessi V. Kang M., Barberis A., Maj R., Mura E., Passini N., Holldack J., Ochoa R., Cottam H., Carson D., Hayashi T. Inhibition of keratinocyte proliferation by phospholipid-conjugates of a TLR7 ligand in a Myc-induced hyperplastic actinic keratosis model in the absence of systemic side effects. *Eur J Dermatol* 2013; 23(5): 618-28
- 104 Schön M, Bong AB, Drenniok C, Herx J, Geilen CC, Reifenberger J et al. (2003). Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst* 95: 1138–1149.
- 105 2011 Apr 12;29(17):3341-55. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.08.002. Epub 2010 Aug 14.TLR-based immune adjuvants.Steinbagen F<sup>1</sup>, Kinjo T, Bode C, Klinman DM.
- 106 2012 Sep;23 Suppl 8:viii6-9. doi: 10.1093/annonc/mds256.Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer.Finn OJ<sup>1</sup>.
- 107 2000 Dec;21(12):624-30.Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity.Ochsenbein AF<sup>1</sup>, Zinkernagel RM.
- 108 Smith KJ, Germain M, Skelton H. (2001). Squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease) in renal transplant patients treated with 5% imiquimod and 5% 5-fluorouracil therapy. *Dermatol Surg* 27: 561–564

- 109 He X, Jia H, Jing Z, Liu D. Recognition of pathogen-associated nucleic acids by endosomal nucleic acid-sensing toll-like receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013 Apr;45(4):241-58. [PubMed: 23369718]
- 110 Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Apr;22(2):240-73. [PubMed: 19366914]
- 111 Noppert SJ, Fitzgerald KA, Hertzog PJ. The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol Cell Biol*. 2007 Aug-Sep;85(6):446-57. [PubMed: 17667935]
- 112 Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Feb 13;1589(1):1-13. [PubMed: 11909637]
- 113 Wadler S, Schwartz EL. New Advances in Interferon Therapy of Cancer. *Oncologist*. 1997;2(4):254-267. [PubMed: 10388057]
- 114 Lai YP, Jeng CJ, Chen SC. The Roles of CD4+ T Cells in Tumor Immunity. *ISRN Immunology*, vol. 2011, Article ID 497397, 6 pages, 2011.
- 115 Eguizabal C, Zenarruzabeitia O, Monge J, Santos S, Vesga MA, Maruri N, Arrieta A, Riñón M, Tamayo-Orbegozo E, Amo L, Larrucea S, Borrego F. Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. *Front Immunol*. 2014 Sep 15;5:439. [PubMed: 25309538]
- 116 Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011 Jan 7;331(6013):44-9.[PubMed: 21212348]
- 117 Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med*. 2007 May;13(5):552-9. [PubMed: 17479101]
- 118 Basith S, Manavalan B, Lee G, Kim SG, Choi S. Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010). *Expert Opin Ther Pat*. 2011; 21:927–44. [PubMed: 21406035]
- 119 Barrat FJ, Coffman RL. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol Rev*. 2008; 223:271–283. [PubMed: 18613842]
- 120 Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*. 2010;2010. pii: 672395. [PubMed: 20706656]
- 121 Granucci F, Zanoni I. Role of Toll like receptor-activated dendritic cells in the development of autoimmunity. *Front Biosci*. 2008 May 1;13:4817-26. [PubMed: 18508547]
- 122Jiang W, Zhu FG, Bhagat L, Yu D, Tang JX, Kandimalla ER, La Monica N, Agrawal S. A Toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonist inhibits Th1 and Th17 responses and inflammasome activation

*in a model of IL-23-induced psoriasis. J Invest Dermatol. 2013 Jul;133(7):1777-84. [PubMed: 23370539]*

123 O'Neill LA, Bryant CE, Doyle SL. *Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. Pharmacol Rev. 2009 Jun;61(2):177-97. [PubMed: 19474110]*

124 Goedert M., Ghatti M.. "Alois Alzheimer: his life and times". *Brain Pathol.* (2007) Jan;17(1):57-62. Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge.

125 Agorogiannis EI, Agorogiannis GI, Papadimitriou A, Hadjigeorgiou GM. "Protein misfolding in neurodegenerative diseases." *Neuropathol Appl Neurobiol* 30: 215–224. (2004)

126 Dimitrios Avramopoulos. "Genetics of Alzheimer's disease: recent advances". Institute of Genetic Medicine and Department of Psychiatry, Johns Hopkins University School of Medicine, Broadway Research Building Room 509, 733 N Broadway, Baltimore, MD 21205, USA Published: 27 March 2009 *Genome Medicine* 2009, 1:34 (doi:10.1186/gm34)

127 Swasti Raychandhuri, Sucharita Dey, Nitai P. Bhattacharyya, Debashis Mukhopadhyay "The Role of Intrinsically Unstructured Proteins in Neurodegenerative Diseases". Published May 15, 2009; PLoS ONE

128 Glenner GG, Wong CW. "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein". *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 May 16;120(3):885-90

129 Anna Kowalska. "Amyloid precursor protein gene mutations responsible for early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease" Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland. *Folia Neuropathol.* Vol. 41, No. 1, pp. 35–40; 2003 Review article issn 1641–4640

130 Tanzi RE, Gusella JF, Walkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM., Neve RL (1987) "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus." *Science*, 235: 880–884.

131 Selkoe DJ (1998) "The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease". *Trends Cell Biol*, 8, 11: 447–453

132 Antonella Bobba, Vito A. Petragallo, Ersilia Marra, and Anna Atlante. "Alzheimer's Proteins, Oxidative Stress, and Mitochondrial Dysfunction Interplay in a Neuronal Model of Alzheimer's Disease". *International Journal of Alzheimer's Disease* Volume 2010, Article ID 621870, 11 pages doi:10.4061/2010/621870 Received 14 April 2010; Revised 24 June 2010; Accepted 9 July 2010

133 Esler WP and Wolfe MS ,2001. "A portrait of Alzheimer secretases new features and familiar faces". *Science*, 293:1449–1454.

- 134 Selkoe DJ (1991) "The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*". 6: 487–498.
- 135 Stephanie J. Soscia, James E. Kirby, Kevin J. Washicosky, Stephanie M. Tucker, Martin Ingelsson, Bradley Hyman, Mark A. Burton6,, Lee E. Goldstein, Scott Duong, Rudolph E. Tanzi, Robert D.Moir . "The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid b-Protein Is an Antimicrobial Peptide" Published March 3, 2010;PLoS ONE.
- 136Thomas Wisniewski<sup>1</sup> and Einar M. Sigurdsson, "Therapeutic approaches for prion and Alzheimer's diseases". *FEBS Journal* 274 (2007) 3784–3798 a 2007
- 137 Wisniewski, H. M. & Terry, R. D. Zimmerman, H. M..(1973) "Progress in Neuropathology", Vol. 2, pp. 1-26.
- 138Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L.& Beyreuther, K. (1985) *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 82, 4245-4249.
- 139S. M. Cardoso, I. Santana, R. H. Sverdlow, and C. R. Oliveira, "Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances A $\beta$  toxicity," *Journal of Neurochemistry*, vol. 89, no. 6, pp. 1417–1426, 2004.
- 140C. Barbato, N. Canu, N. Zambrano et al., "Interaction of Tau with Fe65 links tau to APP" *Neurobiology of Disease*, vol. 18, no. 2, pp. 399–408, 2005.
- 141 M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, and R. A. Crowther, "Multiple isoforms of human Microtubuleassociated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease," *Neuron*, vol. 3, no. 4, pp. 519–526, 1989.
- 142 L. S. Honig and R. N. Rosenberg, "Apoptosis and neurologic disease," *The American Journal of Medicine*, vol. 108, no. 4,pp. 317–330, 2000.
- 143 Bird, TD.; Miller, BL. "Alzheimer's disease and primary dementias". In: Kasper, D.; Fauci, A.; Braunwald, E., et al., editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Vol. 16 ed.. McGraw-Hill; NY: 2005. p.2393-406.
- 144 Braak, H. & Braak, E. (1991) *Acta Neuropathol.* 81, 261-268.
- 145 Alzheimer A: "Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allg Z Psychiat Med* 1907, 64:146-148
- 146 McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. & Stadlan, E. M. (1994) *Neurology* 34, 939-944.
- 147 Rosenberg RN. "The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg Lecture". *Neurology* 2000;54:2045–54.[PubMed: 10851361]

- 148 Wisniewski T, Castano EM, Golabek AA, Vogel T & Frangione B (1994) "Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro". *Am J Pathol* 145, 1030–1035.
- 149 S. E. Mason, R. McShane, and C. W. Ritchie "Diagnostic Tests for Alzheimer's Disease: Rationale, Methodology, and Challenge" *International Journal of Alzheimer's Disease Volume 2010*, Article ID 972685, 6 pages doi:10.4061/2010/972685, 2010
- 150 Z. Nagy, M. M. Esiri, N. J. Hindley et al., "Accuracy of clinical operational diagnostic criteria for Alzheimer's disease in relation to different pathological diagnostic protocols," *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, vol. 9, no. 4, pp. 219–226, 1998.
- 151 Meeting annuale dell'American College of Neuropsychopharmacology (ACNP), 2004
- 152 L. E. Middleton and K. Yaffe, "Promising strategies for the prevention of dementia," *Archives of Neurology*, vol. 66, no. 10, pp. 1210–1215, 2009
- 153 Sigurdsson EM, Scholtzova H, Mehta P & Frangione B & Wisniewski T (2001) "Immunization with a non-toxic / non-fibrillar amyloid-B homologous peptide reduces Alzheimer's disease associated pathology in transgenic mice". *Am J Pathol* 159, 439–447.
- 154 Sadowski M & Wisniewski T (2004) "Vaccines for conformational Disorders". *Exp Rev Vaccines* 3, 89–100.
- 155 Giancarlo Calzolari "ALZHEIMER: E' LA PROTEINA BETA AMILOIDE A DISTRUGGERE I NEURONI" 3 Aprile 2008 Conference On Neurodegenerative Disorders di Torino
- 156 M. Boca, M. Izakovic, G. Kickelbick, M. Valko, F. Renz, H. Fuess, K. Matuzsna: Structure of the copper(II) perchlorate complex with Schiff base ligand containing pyridine N-oxide fragments and propylene bridges: Solvatochromic effect. *Polyhedron* 24, 1913–1921 (2005).
- 157 The American Society for Clinical Nutrition, Copper biochemistry and molecular biology Maria C Linder and Maryam Hasegh-Azam
- 158 2010;19(1):311–23. doi: 10.3233/JAD-2010-1221. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. Murphy MP<sup>1</sup>, LeVine H 3<sup>rd</sup>
- 159 1999 Jan;9(1):165–86. Oxidative stress and motor neurone disease. Cookson MR<sup>1</sup>, Shaw PJ
- 160 Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease Rosanna Squitti<sup>a, b, c</sup>, Mariacristina Siotto<sup>c</sup>, Renato Polimanti<sup>d</sup> September 2014, Pages S40–S50 International Conference on Nutrition and the Brain — Proceedings of a symposium held in Washington, D.C., July 19–20, 2013
- 161 Barnham K. J., McKinstry W. J., Multhaup G., Galatis D., Morton C. J., Curtain

C.C.,WilliamsonNA.,WhiteA. R.,Hinds M.G.,Norton R. S.,BeyreutherK.,MastersC. L.,Parker M. W.,CappaiR. (2003)Structure of the Alzheimerdiseaseamyloid precursorprotein copperbinding domain.Aregulatorof neuronal copperhomeostasis.J. Biol.Chem. 278,17401–17407.

162Bayer,T.,Schafer,S.,Breyhan,H.,Wirths,O.,Treiber,C.,Multhaup,G.,2006.Clin.Neuropathol. 25,163-171.

163LovellM. A.,RobertsonJ. D.,TeesdaleW. J.,CampbellJ. L.,MarkesberyW.R. (1998) Copper, iron, and zinc in Alzheimer disease senile plaques.J. Neurol. Sci.158,47–52

164 Tanzi RE, Gusella JF, Walkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM., Neve RL (1987)“Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus.”Science, 235: 880–884

165 Berliner L. J., Reuben J., in Biological Magnetic Resonance, Spin Labeling, “Theory and Applications”, ed Plenum Press: N.Y. (1976), vol I; Vol. II, (1989), vol.8.

166 Butterfield, D. A., in Biological Magnetic Resonance, Berliner L. J., ed. Plenum Press: N.Y. 1982, vol 4, pp1-68.

167 Abragam B., Bleaney B., “Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions”, Claredon Press: Oxford, [1970].

168 Atherton, N. M.: “Electron Spin Resonance”, ed. J. Wiley, Press: N.M., (1973)

169 Carrington A., Mc Lachlan A. D., “Introduction to Magnetic Resonance”, ed. Harper and Row Press, N. Y., (1969)

170 EMX User’s Manual: ‘EPR applications; The spectrometer; Basic EPR theory; Basic EPR Practice”